

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

CARACTÉRISATION FONCTIONNELLE DE *GIT-1*, *PIX-1* ET *PAK-1* CHEZ  
*C.ELEGANS*

MÉMOIRE  
PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR SHARON HAREL

AOÛT 2010

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

À mon père, mon frère

## REMERCIEMENTS

Je remercie la Professeure Sarah Jenna, de m'avoir accueillie dans son laboratoire. Je remercie aussi mes collaborateurs : Dr Xavier Debolle (Namur, Belgique), Dr Baillie et son équipe; Dr Bob Johnsen et Carrie Simms (Simon Fraser, BC), Affaf Megherbi, Steen Schougaard et Ricardo Izquierdo (UQAM), Dr Richard Roy (Université McGill) ainsi que Paul Mains (Université de Calgary, Alberta) pour leur aide, leur expertise et/ou le matériel fourni pour la complétion de mon projet.

Plus particulièrement, je souhaite remercier mon mari, Hichem, pour son support, sa compréhension et ses conseils durant les jours les plus gris, même si je ne l'ai pas toujours écouté. Il fut une source d'inspiration et me poussa à me dépasser continuellement, en m'empêchant de tomber dans l'autosatisfaction. Merci à toute ma famille pour leur patience et leur compréhension.

Finalement, je tiens à souligner le soutien financier du Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et Génie du Canada (CRSNG), Les Bourses d'Études Supérieures du Canada (BESC) et les Fonds de Recherches de la Santé du Québec (FRSQ) durant les deux années de ma maîtrise, ainsi que les bourses FARE et un merci particulier aux Dr Janine Mauzeroll, Benoît Marsan, Joanne Paquin, Serge St-Pierre (UQAM) et David Thomas (McGill) pour leurs conseils dans la rédaction des demandes de bourses.

Je souligne aussi le travail du comité d'évaluation de mon mémoire, le Dr Jean-Claude Labbé et le Dr Nicolas Pilon, qui ont dû lire assidûment chaque ligne de ce mémoire.

Merci à tous ceux que j'oublie et qui ont aussi directement ou indirectement contribué à ma réussite!

## TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES FIGURES.....	xi
LISTE DES ABBRÉVIATION .....	xiv
Chapitre 1: Revue de la littérature et intérêts de l'étude.....	1
1.1 GTPases monomériques et signalisation cellulaire .....	1
1.1.1 Propriétés des GTPases monomériques et de leurs régulateurs .....	1
1.1.2 Les GTPases Arfs .....	3
1.1.3 Les GTPases Rhos .....	5
1.1.4 Interactions communicatives et intégration des signaux cellulaires par les GTPases monomériques .....	7
1.1.5 Les GTPases chez <i>C. elegans</i> .....	8
1.2 GTPases Rhos et développement embryonnaire .....	10
1.2.1 Le développement embryonnaire chez les métazoaires .....	10
1.2.2 La morphogenèse .....	11
1.2.3 Adhérence cellulaire .....	11
1.2.4 La migration cellulaire .....	13
1.3 GTPase Rhos et le retard mental.....	17
1.3.1 Le retard mental.....	17
1.3.2 Le siège de la cognition.....	19
1.3.3 La plasticité synaptique et la cognition.....	20
1.3.4 Les voies de signalisation contrôlant la plasticité synaptique .....	21
1.3.5 Implication des GTPases monomériques et retard mental.....	24
1.3.6 GTPases Rhos et PLT / DLT.....	26
1.3.7 GTPases Rhos et formation/morphologie des épines dendritiques et des synapses .....	28
1.3.8 GTPases Rhos et transport vésiculaire.....	29
1.4 PIX GIT et PAK: une plateforme de signalisation .....	30
1.4.1 PAK.....	31

1.4.2 GIT .....	33
1.4.3 PIX.....	34
1.4.4 Régulation du complexe PIX/GIT/PAK .....	36
1.4.5 PIX/GIT/PAK: morphogenèse et migration .....	38
1.4.6 PIX /GIT/ PAK et la plasticité synaptique.....	40
1.4.7 PIX/GIT/PAK chez <i>C. elegans</i> .....	42
1.5 Le développement chez <i>C. elegans</i> .....	50
1.5.1 Développement embryonnaire et morphogenèse.....	50
1.5.2 L'intercalation dorsale des cellules hypodermiques.....	50
1.5.3 La fermeture ventrale.....	51
1.5.4 L'élongation .....	52
1.5.5 Régulation de la formation des jonctions apicales .....	55
1.5.6 Régulation de l'appareil contractile d'actine-myosine durant l'élongation .....	55
1.5.7 Régulation de la formation des corps denses .....	57
1.5.8 La signalisation des GTPases Rhos lors de l'élongation embryonnaire .....	58
1.6 Le comportement chez <i>C. elegans</i> .....	59
1.6.1 Les récepteurs au glutamate et le comportement .....	59
1.6.2 Mécanismes de localisation de GLR-1.....	60
1.6.3 Le comportement de forage .....	61
1.7 Objectifs de l'étude et hypothèses.....	63
1.7.1 Hypothèses.....	63
1.7.2 Objectifs.....	64
1.7.3 Contributions .....	64
Chapitre 2: Matériel et Méthode .....	66
2.1 Méthodes standards .....	66
2.1.1 Culture de <i>C. elegans</i> .....	66
2.1.2 Génération de mâles.....	67
2.1.3 Croisement .....	68
2.1.4 Génotypes .....	68
2.1.5 Synchronisation à l'hypochlorite.....	69

2.1.6 Microscopie.....	69
2.2 Biologie moléculaire : génération des outils pour l'étude .....	70
2.2.1 Génération de l'ORF de <i>pix-1</i> .....	70
2.2.2 Clonage des ORFs pour la production d'ARN double brin.....	72
2.3 Génération de transgéniques.....	72
2.3.1 Génération de fosmides modifiés.....	72
2.3.2 Injection des fosmides modifiés.....	73
2.4 Caractérisation phénotypique et allélique .....	73
2.4.1 Létalité mbryonnaire et larves non-allongées.....	73
2.4.2 Contraction du pharynx.....	74
2.4.3 Taux de ponte .....	74
2.4.4 Taux de défécation .....	74
2.4.5 Caractérisations alléliques.....	75
2.4.6 Microscopie dynamique à quatre dimensions.....	76
2.5 Interactions génétiques et chimio-génétiques .....	77
2.5.1 Génération de doubles et triples mutants.....	77
2.5.2 Traitements avec inhibiteurs chimiques.....	77
2.6 Interactions génétiques avec les GTPases Rhos et Arfs.....	78
2.6.1 Traitement à l'ARN interférant en liquide.....	78
2.7 Interactions génétiques avec les composantes des corps denses .....	79
2.7.1 Traitement à l'ARN interférant sur solide .....	79
2.8. Interaction avec GLR-1 .....	79
2.8.1 Quantification du phénotype de recherche en zone restreinte et dispersion..	79
2.8.2 Études comportementales dans les labyrinthes.....	80
2.8.3 Quantification de l'expression de GLR-1::GFP.....	81
2.8.4 Quantification et localisation de GLR-1::GFP par microscopie à fluorescence	82
2.8.5 Colocalisation de GLR-1::GFP et PIX-1::mCherry.....	83
Chapitre 3: Résultats- <i>pix-1</i> / <i>git-1</i> / <i>pak-1</i> et leur fonction développementale .....	84
3.1 Caractérisation allélique .....	84

3.1.1 L'allèle de <i>git-1</i> ( <i>ok1848</i> ) .....	84
3.1.2 L'allèle de <i>pix-1</i> ( <i>ok982</i> ) .....	85
3.1.3 L'allèle de <i>pix-1</i> ( <i>gk416</i> ) .....	86
3.1.4 L'allèle de <i>pak-1</i> ( <i>ok448</i> ) .....	86
3.1.5 Évaluation de la dominance des allèles de <i>pix-1</i> , <i>git-1</i> et <i>pak-1</i> .....	87
3.2 Caractérisation phénotypique de <i>pix-1</i> , <i>git-1</i> et <i>pak-1</i> .....	88
3.2.1 <i>pix-1</i> , <i>git-1</i> et <i>pak-1</i> montrent un défaut d'élongation et une létalité embryonnaire .....	88
3.2.2 <i>pix-1</i> , <i>git-1</i> et <i>pak-1</i> montrent un défaut de contraction du pharynx .....	90
3.3 Caractérisation fonctionnelle de <i>pix-1</i> , <i>git-1</i> et <i>pak-1</i> .....	91
3.3.1 PIX-1, GIT-1 et PAK-1 contrôlent la contraction du pharynx .....	91
3.3.2 Patron d'expression de PIX-1, GIT-1 et PAK-1 .....	93
3.3.3 <i>pix-1</i> et <i>pak-1</i> interagissent avec les composantes de la voie <i>mel-11/let-502</i> .....	95
3.3.4 <i>pix-1</i> , <i>git-1</i> et <i>pak-1</i> contrôlent la fonction de la myosine II durant l'élongation tardive .....	98
3.3.5 <i>pix-1</i> , <i>pak-1</i> et <i>git-1</i> , induisent une réduction de la vitesse d'élongation .....	101
3.3.6 Les homologues de PAK-1, MAX-2 et PAK-2 et l'élongation embryonnaire .....	104
3.3.7 Redondance de PIX-1 avec Tiam-1 au cours de l'élongation embryonnaire .....	105
3.4. Identification des GTPases impliquées dans l'élongation tardive .....	107
3.4.1 Interactions avec les GTPases Rhos .....	107
3.4.2 Épistasie des interactions génétiques avec les GTPases Rhos .....	109
3.3.2 Interactions entre <i>max-2</i> , <i>pak-2</i> et les GTPases Rhos .....	110
3.4.3 Interactions avec les GTPases Arfs .....	111
3.5 interaction avec les composantes des corps denses .....	113
3.5.1 Interactions génétiques entre <i>ina-1</i> et <i>pix-1/pak-1 / git-1</i> dans le processus d'élongation tardive .....	113
3.5.2 Interactions génétiques entre <i>git-1/pak-1</i> et <i>pat-6</i> et <i>pxl-1</i> .....	115
Chapitre 4: Résultats- <i>pix-1</i> et sa fonction neuronale .....	118
4.1 Caractérisation phénotypique comportementale .....	118
4.1.1 <i>pix-1</i> ( <i>gk416</i> ) présente un taux de défécation et de ponte altéré .....	118
4.1.2 <i>pix-1</i> régule le comportement de forage .....	120



4.1.3 <i>pix-1</i> et <i>git-1</i> régulent le comportement de navigation dans les environnements complexes.....	122
4.2 PIX-1 régule la signalisation glutamatergique.....	124
4.2.1 PIX-1 régule l'expression de GLR-1 ::GFP .....	124
4.2.2 PIX-1 régule l'accumulation de GLR-1 ::GFP aux membranes post-synaptiques .....	125
4.2.3 PIX-1 ne colocalise pas avec GLR-1 .....	128
Chapitre 5: Discussion.....	129
5.1 Principales conclusions de l'étude.....	129
5.1.1 <i>pix-1</i> , <i>git-1</i> et <i>pak-1</i> contrôlent la contraction du pharynx.....	129
5.1.2 <i>pix-1</i> , <i>git-1</i> et <i>pak-1</i> sont impliqués dans l'élongation précoce .....	132
5.1.3 <i>pix-1</i> , <i>git-1</i> , <i>pak-1</i> , <i>mel-11</i> contrôlent l'élongation tardive par la régulation de l'activité des CLMr et de la myosine II .....	136
5.1.4 Les GTPases Rhos contrôlent l'élongation tardive .....	139
5.1.5 Les GTPases Arfs contrôlent l'Élongation tardive .....	143
5.1.6 PAK-1, PAK-2 et MAX-2 contrôlent l'élongation tardive.....	144
5.1.7 PIX-1 n'est pas redondant avec Tiam-1 lors de l'élongation tardive .....	146
5.1.8 INA-1 signale via PIX-1, GIT-1 et PAK-1 lors de l'élongation tardive.....	146
5.1.9 GIT-1 et PAK-1 ont une fonction indépendante de PIX-1 lors de l'élongation tardive .....	147
5.1.8 PIX-1 régule négativement la signalisation glutamatergique de manière indirecte .....	149
5.2 Limites de l'étude.....	151
5.2.1 L'étude de l'expression de PIX-1 ::mCherry .....	151
5.2.2 Confirmation de la fonction de <i>pix-1</i> .....	152
5.2.3 Extrapolation des résultats aux organismes supérieurs .....	152
5.2.4 Étude de la redondance fonctionnelle.....	154
5.2.4 Interaction génétiques avec les GTPases.....	154
5.3 Perspectives de recherches.....	155
5.3.1 Approfondissement de la caractérisation .....	155
5.3.2 Un modèle pour l'identification de mécanismes moléculaires et de cible thérapeutique .....	156

5.4 Conclusions .....	157
-----------------------	-----

## LISTE DES TABLEAUX

Table 1-1 : Phénotypes des mutants <i>glr</i> .....	59
Table 2-1 : Liste des souches utilisées ou générées pour cette étude. ....	67
Table 2-2 : Amorces pour le génotypage.....	69
Table 2-3 : Séquence des amorces Gateway pour l'ORF de <i>pix-1</i> .....	70
Table 2-4 : Conditions PCR pour l'amplification de l'ORF de <i>pix-1</i> .....	71
Table 2-5 : Amorces pour la recombinaison .....	73
Table 2-6 : Amorce de l'identification de la délétion de <i>git-1(ok1848)</i> .....	75
Table 2-7 : Cycles PCR pour l'amplification de <i>git-1 (ok448)</i> .....	76
Table 2-8 : Réglages de visualisation du COPAS BIOSORT.....	81
Table 2-9: Réglages d'amplification du signal du COPAS BIOSORT.....	81
Table 3-1 : Caractérisation de la dominance allélique de <i>pix-1</i> , <i>git-1</i> et <i>pak-1</i> .....	88
Table 3-2 : Quantification de la létalité embryonnaire et des larves non-allongées.....	89
Table 3-3 : Interaction génétique avec <i>mel-11</i> et <i>let-502</i> .....	98
Table 3-4 : Traitement à la blebbistatine et interactions génétiques de <i>pix-1</i> , <i>git-1</i> et <i>pak-1</i> , avec la myosine II. ....	99
Table 3-5 : Traitement à la Calyculin A et mise en évidence d'interactions génétiques entre <i>pix-1</i> et <i>git-1</i> et <i>mel-11</i> lors de l'élongation tardive.....	100
Table 3-6 : Traitement ML-7 et mise en évidence d'interactions génétiques entre <i>pix-1</i> , <i>git-1</i> et <i>pak-1</i> et une MLCK.....	101
Table 3-7 : Caractérisation de <i>max-2</i> et <i>pak-2</i> et des interactions avec la myosine II et MLCK. .....	105
Table 3-8 : Caractérisation phénotypique de <i>C11D9.1(ok772)</i> .....	107

## LISTE DES FIGURES

Figure 1-1 : Régulation de l'activité des GTPases.....	3
Figure 1-2 : Cycle d'activation des GTPases Arfs.....	4
Figure 1-3 : Cycle d'activation des GTPases Rhos.....	5
Figure 1-4 : Conservation des Rho GAPs entre l'homme et le nématode .....	10
Figure 1-6 : La cascade de signalisation par les GTPases au cours de la migration cellulaire. .....	16
Figure 1-7 : Pathologies dendritiques et retard mental .....	18
Figure 1-8 : La voie lente menant à la consolidation de la PLT .....	22
Figure 1-9 : La voie rapide menant à l'initiation de la PLT .....	24
Figure 1-10 : Les GTPases monomériques et le retard mental.....	26
Figure 1-11 Structure de PAK1 et PAK3 .....	32
Figure 1-12 : Structure de GIT1 .....	34
Figure 1-13 Structure d' $\alpha$ et $\beta$ -PIX .....	35
Figure 1-14: Roulement des complexes focaux.....	39
Figure 1-15 : $\beta$ -PIX et Scribble dans la polarité et la migration cellulaires .....	40
Figure 1-16 : Fonction du Complexe GIT/PIX/PAK à la synapse.....	42
Figure 1-17 : Homologue de PAK-1/3 humain chez le nématode .....	43
Figure 1-18 : Homologue de PIX humain chez le nématode.....	44
Figure 1-19 : Séquence consensus du domaine PDZ de PIX-1 .....	45
Figure 1-20 : Homologue de GIT-1 humain chez le nématode.....	46
Figure 1-21 : Identification du domaine d'interaction avec la Paxillin en position C-terminale de GIT-1 .....	46
Figure 1-22 : GIT/PIX/PAK régule l'élongation des Gonades. ....	48
Figure 1-23 : PAK-1 régule l'activité des CLM durant l'élongation des embryons chez <i>C. elegans</i> . ....	49
Figure 1-24 : L'intercalation des cellules dorsales.....	51
Figure 1-25: La fermeture ventrale .....	52
Figure 1-26: L'élongation des cellules de l'épiderme.....	53
Figure 1-27 : Structure de l'épiderme embryonnaire et stade d'élongation .....	54

Figure 1-28 : Régulation spatiale de la contraction de l'appareil actine-myosine.....	56
Figure 1-29 Comportement de forage et signalisation glutamatergique.....	61
Figure 1-30: Neurones contrôlant le comportement de forage.....	63
Figure 2-1 : Méthode pour la quantification et la localisation de GLR-1::GFP par microscopie à fluorescence.....	83
Figure 3-1 : Caractérisation moléculaire de l'allèle <i>git-1 (ok1848)</i> . ....	85
Figure 3-2 : Caractérisation moléculaire des allèles <i>pix-1 (gk416)</i> et <i>(ok982)</i> . ....	86
Figure 3-3 : Caractérisation moléculaire de l'allèle <i>pak-1 (ok448)</i> . ....	87
Figure 3-4 : L'élongation des larves arrêtées <i>pix-1</i> , <i>git-1</i> et <i>pak-1</i> est incomplète. ....	90
Figure 3-5: <i>pix-1</i> , <i>git-1</i> et <i>pak-1</i> présentent un défaut de contraction du pharynx.....	91
Figure 3-6 : <i>pix-1</i> , <i>git-1</i> , <i>pak-1</i> ont un impact sur la contraction du pharynx.....	93
Figure 3-6: Profil d'expression de PIX-1::mCherry .....	94

Figure 3-7 : Expression et localisation de PIX-1::mCherry et GIT-1::GFP.....	95
Figure 3-9: Caractéristiques morphologiques des larves arrêtées .....	97
Figure 3-10: <i>pix-1</i> , <i>git-1</i> , <i>pak-1</i> et <i>let-502</i> ont une vitesse d'élongation réduite .....	103
Figure 3-11: Interaction génétiques des GTPases Rhos avec <i>pix-1</i> , <i>git-1</i> et <i>pak-1</i> .....	109
Figure 3-12 : Caractérisation des interactions génétiques par le coefficient d'épistasie. ....	110
Figure 3-13: Relations d'épistasie de <i>max-2</i> , <i>pak-2</i> et <i>ced-10</i> .....	111
Figure 3-14: Épistasie des GTPases Arfs avec <i>pix-1</i> , <i>git-1</i> et <i>pak-1</i> .....	113
Figure 3-15 : <i>ina-1</i> signale via <i>pix-1</i> , <i>git-1</i> et <i>pak-1</i> lors de l'élongation tardive.....	115
Figure 3-17 : <i>git-1</i> et <i>pak-1</i> sont antagonistes à <i>pat-6</i> et <i>pkl-1</i> .....	117
Figure 4-1: <i>pix-1</i> altère différents comportements chez le nématode.....	120
Figure 4-2 : Les animaux <i>pix-1(gk416)</i> ont un comportement de recherche de nourriture altéré.....	121
Figure 4-3: <i>pix-1</i> et <i>git-1</i> montrent une navigation altérée.....	123
Figure 4-4: <i>pix-1 (gk416)</i> réduit le niveau d'expression de GLR-1::GFP.....	125
Figure 4-5 : GLR-1 ::GFP s'accumule au niveau post-synaptique chez le mutant <i>pix-1</i> .....	126
Figure 4-6: <i>pix-1(gk416)</i> a moins de synapses exprimant GLR-1 ::GFP mais l'exprime plus fortement.....	127
Figure 4-7 : PIX-1::mCherry et GLR-1::GFP ne colocalise pas.....	128
Figure 5-1: PIX-1, GIT-1 et PAK-1 régule positivement l'activation de la myosine II et le rythme des contractions du pharynx.....	132
Figure 5-2 :Voie de signalisation contrôlant l'élongation précoce. ....	135
Figure 5-3 : Voies régulant l'activité des CLMr et de la myosine II au cours de l'élongation tardive.....	139
Figure 5-4 : Résumé des interactions avec les GTPases Rhos : .....	141
Figure 5-5: L'antagonisme de <i>pak-1</i> et <i>ced-10</i> .....	142
Figure 5-6 : PAK-1/2 sont redondants et antagonistes à MAX-2/CED-10 .....	145

## LISTE DES ABBRÉVIATION

ACAM	: appareil contractile d'actine-myosine
Actine-F	: Actine filamenteuse
ADN	: acide déoxyribonucléique
AID	: auto-inhibitory domain
AMPAR	: $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor
AP1	: Apatela 1
AP2	: Apatela 2
APC	: Anaphase promoting complexe
AR	: récepteur androgène
Arf	: Facteur de la ribosylation de l'Adénosine diphosphate
ARN	: acide ribonucléique
ARNi	: Acide ribonucléique interférant
ARNm	: ARN messenger
Arp2/3	: Nuclear actin-related protein
ATE	: attachement trans-épidermique
CA	: constitutivement actif
CBP	: Creb binding protein
CC	: domaine coiled-coiled
CGC	: Caenorhabditis Genetics Center
CH	: calponine homology domain
CLMr	: Chaîne légères de myosine régulatrice
COPI	: Protéine morphogénique constitutive I
COPII	: Protéine morphogénique constitutive II
DEPC	: Diéthyl pyrocarbonate
DH	: Dbl homology domain
DIC	: Differential interference contrast
DLT	: dépression à long terme
DN	: Dominant négatif
DNTP	: déoxyribonucléotide trisphosphate
DOP	: Dopamine
Ec	: Coefficient d'épistasie
EGFR	: Epidermal Growth factor Receptor
Emb	: phénotype de létalité embryonnaire
ERK	: Extracellular signal regulated kinase
Era	: récepteur à l'estrogène alpha

EXT	: Extinction
FAC	: Filament d'actine circonférentielle
FAH	: Focal Adhesion targetting homology
FAK	: focal adhesion kinase
FGFR	: Fibroblast growth factor receptor
FMRP	: Fragile X Mental Retardation Protein
FPR	: Formyl-Peptide Receptor
GAP	: GTPase activating protein
GBD	: GIT binding domain
GDI	: GDP dissociation inhibitor
GDP	: guanosine diphosphate
GEF	: GDP exchange protein
GIT	: G protein coupled receptor kinase-interacting protein
GO	: Gene ontology
GPCR	: récepteurs couplé aux protéines G
Grb-2	: growth factor bound protein 2
Grb4	: growth factor receptor binding protein 4
GTP	: guanosine triphosphate
HIC5	: Hydrogen induced clone 5
ILK	: integrin-linked kinase
IPTG	: Isopropyl $\beta$ -D-l-thiogalactopyranoside
JNK	: c-Jun N-terminal kinases
LIMK	: LIM motif-containing protein Kinase
MAPK	: Mitogen activated protein kinase
MEK	: MAPK/ERK kinase
mGLUR	: metabotropic glutamate receptor
MLCK	: Myosine light chain kinase
MLK	: mixed lineage kinase
MRCK	: Myotonic dystrophy kinase related Cdc42-binding kinase
NADPH	: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NaLv	: phénotype de larve non-allongée
NCK	: non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1
NES	: nuclear export signal
NF1	: Neurofibromin 1
NGM	: Nematode growth medium
NLS	: nuclear localisation signal
NMDAR	: N-methyl-D-aspartate receptor
OPHN1	: oligophrenin 1
ORF	: Open Reading Frame



PAK	: p21 activated kinase
pb	: paire de base
PBD	: p21 binding domain
PBS	: Paxillin binding sub-domain
PCR	: Réaction de polymérase en chaîne
PDZ	: domaine d'interaction à PSD95 DlgA Zonula occuldens 1
PER	: Protéine escorte des rabs
PH	: domaine d'homologie à la pleckstrin
PI3K	: Phosphatidylinositol-3-kinase
PIP3	: Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PIX	: p21 activated kinase interacting exchange factor
PKA	: cAMP-dependent protein kinase
PLC $\gamma$	: Phospholipase C gamma
PLT	: Potentialisation à long terme
POI	: Path of interest
POPX2	: partenaire de PIX 2
PP2A	: protéine phosphatase 2A
PR	: Proline Riche
PS	: Plasticité synaptique
Rho	: Homologue de la famille Ras
RM	: Retard Mental
ROCK	: Rho associated protein kinase
ROI	: Region of Interest
rpm	: révolution par minute
RSK2	: Ribosomal S6 protein kinase 2
RTK	: Récepteur à activité tyrosine kinase
RZR	: Recherche en Zone Restreinte
SAGE	: serial analysis of gene expression
SH3	: SRC 3 homology domain
SHD	: spa2 homology domain
SLD	: synaptic localisation domain
SOS	: son of sevenless
Src	: sarcoma
TOF	: Time of flight
TRITC	: Tetra methyl Rhodamine Iso-Thiocyanate
ZB	: PDZ binding domain

## RÉSUMÉ

Le nématode *Caenorhabditis elegans* est un organisme polyvalent et unique pour l'étude de la biologie du développement, de la neurologie et des mécanismes complexes de signalisation des GTPases. Ce modèle animal offre une opportunité unique pour l'étude du rôle des protéines dans le développement neurologique et les maladies. Les recherches portaient sur trois gènes : *pix-1*, *git-1* et *pak-1*. Chez les mammifères, GIT / PIX / PAK agissent comme une plateforme d'intégration de la signalisation des GTPases Rho et Arf dans les processus biologiques tels que: la polarité cellulaire, la migration, le trafic vésiculaire, la formation des synapses et la morphologie des épines dendritiques. Ces recherches ont amené l'utilisation des approches génétiques et microscopiques pour établir que *pix-1*, *git-1* et *pak-1* contrôlent les phases précoces et tardives de l'élongation de l'embryon par la régulation de l'activité des chaînes légères de myosine (CLM). Les résultats de recherche suggèrent un positionnement de *pix-1* et *pak-1* dans l'une des voies de signalisation contrôlant la phosphorylation de ces CLMs en parallèle de la voie *mel-11* / *let-502*. MEL-11 est une phosphatase des CLMs agissant de façon antagoniste à LET-502 (une kinase effectrice des Rhos) dans l'une des deux voies de signalisation redondantes qui assurent l'étape précoce d'élongation embryonnaire. Les résultats suggèrent, de plus, l'implication de *mel-11* et *let-502* au cours de la phase tardive de l'allongement. Un certain nombre de résultats suggèrent aussi une implication des intégrines *ina-1* dans ces processus. La caractérisation fonctionnelle de *pix-1*, *git-1* et *pak-1* chez les nématodes adultes démontre leur implication dans le contrôle du comportement de recherche de nourriture (comportement de forage). Ce comportement dépend de la neurotransmission glutamatergique et dopaminergique et implique des mécanismes cellulaires similaires à la plasticité synaptique chez les mammifères. Un lien a été établi entre l'expression des récepteurs au glutamate AMPA homologue de GLR-1 et PIX-1 en utilisant la microscopie quantitative, la cytométrie de flux et des tests de comportement dans des labyrinthes micro-fluidiques secs. Les résultats suggèrent que les animaux mutants pour *pix-1* contrôlèrent la neurotransmission glutamatergique de façon indirecte. La conservation fonctionnelle du complexe GIT / PIX / PAK chez les invertébrés permettrait d'utiliser notre modèle dans l'identification de cibles thérapeutiques et de composés actifs contre les pathologies associées à des mutations dans  $\alpha$ PIX et PAK3. Il aidera en outre à fournir des éclaircissements sur la fonction et les mécanismes de régulation des GTPases.

**Mots Clés :** GTPases monomériques, GIT/PIX/PAK, *C. elegans*, signalisation cellulaire, développement embryonnaire, neuro-transmission glutamatergique.

## CHAPITRE 1

### REVUE DE LA LITTÉRATURE ET INTÉRÊTS DE L'ÉTUDE

#### 1.1 GTPASES MONOMÉRIQUES ET SIGNALISATION CELLULAIRE

L'objet de cette étude vise la caractérisation d'une plate-forme de signalisation de la super famille des Ras, composé de régulateurs des GTPases Rhos (**H**omologue de la famille des **R**as) et des GTPases Arfs (**F**acteurs de **R**ibosylation de l'**A**dénosine diphosphate) la plate-forme PIX/GIT. Cette section révisera la régulation de ces deux familles de GTPases ainsi que les interactions communicatives entre les sous-familles de GTPases monomériques.

##### 1.1.1 PROPRIÉTÉS DES GTPASES MONOMÉRIQUES ET DE LEURS RÉGULATEURS

Les GTPases monomériques de la superfamille des Ras se classent en cinq sous-familles (Rab, Arf, Rho, Ran et Ras) et comptent plus de 170 membres. Les GTPases monomériques sont des commutateurs cellulaires qui permettent la transduction des signaux provenant de l'extérieur de la cellule en une réponse biologique appropriée. Elles cyclent entre une forme active liée au GTP (guanosine triphosphate) et une forme inactive liée au GDP (guanosine diphosphate). Les GTPases monomériques possèdent une activité intrinsèque d'hydrolyse du GTP et une activité intrinsèque d'échange du GDP pour le GTP (Takai, Sasaki et Matozaki, 2001). Par contre, ces activités intrinsèques des GTPases sont faibles et sont catalysées par 3 types de régulateurs : les GAPs (GTPase activating protein), qui régulent l'activité GTPasique intrinsèque et permettent de passer de la forme active liée au GTP à la forme inactive liée au GDP, les GEFs (GDP exchange factor), qui régulent l'activité d'échange du

GDP en GTP et permettent de passer de la forme inactive à la forme active, et finalement les GDIs (GDP dissociation inhibitor), qui séquestrent la GTPase sous sa forme inactive liée au GDP (Figure 1-1). En plus de bloquer les GTPases sous leur forme inactive liée au GDP, le régulateur GDI a la capacité de désancrer les GTPases des membranes, en les séquestrant dans le cytoplasme et/ou en leur servant de navette pour l'adressage de ces protéines aux divers compartiments membranaires. En effet, les GTPases monomériques possèdent aussi des modifications lipidiques post-traductionnelles : elles peuvent être farnésylées, géranylgeranylées, palmytoylées ou myristoylées. Ces modifications lipidiques permettent une distribution subcellulaire précise et l'ancrage des GTPases au niveau de membranes cellulaires qui leur sont spécifiques. L'étude des voies de signalisation impliquant les GTPases est complexifiée du fait qu'une même GTPase régule de multiples voies de signalisation. Elles s'assemblent en complexe multi-modulaires avec les composantes de la voie de signalisation qu'elles régulent, elles peuvent lier leur effecteur ou leur cible et s'assembler en complexe multi-modulaire variable, par leurs régulateurs, qui donnent la spécificité de signalisation et ainsi des processus cellulaires disparates. De plus les GTPases sont souvent fonctionnellement liées entre elles de manière hiérarchique dans une voie de signalisation menant à un processus cellulaire particulier. Donc, les voies de signalisation régulées par les GTPases ne sont jamais strictement linéaires (Hall, 1998)

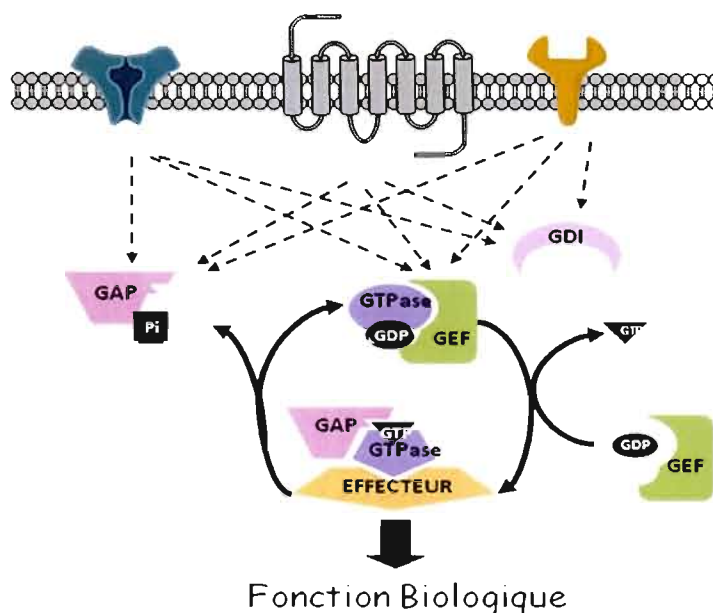


FIGURE 1-1 : RÉGULATION DE L'ACTIVITÉ DES GTPASES. Les GTPases sont des commutateurs moléculaires activées par les GEFs, qui catalysent l'activité d'échange du GDP pour le GTP. À l'inverse, les GTPases sont désactivées par les GAP, qui catalysent l'activité d'hydrolyse du GTP en GDP. Le GDI permet de désancrer la GTPase des membranes, la maintient sous sa forme inactive liée au GDP et lui sert de navette. Tiré de (Harel et Jenna, 2010)

### 1.1.2 LES GTPASES ARFS

Les GTPases de la sous-famille des Arfs régulent le bourgeonnement des vésicules, ainsi que la dynamique du cytosquelette d'actine durant le transport vésiculaire (Radhakrishna *et al.*, 1999). Chez les mammifères, six GTPases Arfs ont été identifiées, soit Arf1 à Arf6. Les Arfs comportent, elles aussi, une modification post-traductionnelle : elles sont myristoylées en position N-terminale. Les Arfs liées au GDP sont retrouvées au niveau du cytosol, vu leur configuration particulière masquant la portion myristoylée. Lorsqu'elles sont activées par leur GEF spécifique, il y a échange du GDP pour le GTP et modification de la conformation, ce qui permet l'interaction entre la protéine Arf et les phospholipides de la bicouche lipidique de la membrane. Le changement de conformation permet, de plus, l'interaction de la protéine Arf avec ses effecteurs, des protéines du manteau sur les vésicules (Goldberg, 1998 ; Roth, 1999). En fait, les protéines Arfs ont la capacité de recruter, au niveau de la membrane, des

protéines du manteau vésiculaire telles que COPI et COPII (Protéine morphogénique Constitutive I et II), ainsi que les protéines adaptatrices du complexe Clathrine (AP1 et AP2 (Apatela 1 et 2)) (Zhu, Drake et Kornfeld, 1999). Ainsi, les Arfs peuvent initier le bourgeonnement d'une vésicule. Une fois le bourgeon formé, une GAP hydrolyse le GTP et la protéine Arf est relarguée dans le cytosol pour procéder au bourgeonnement de la vésicule suivante (Figure 1-2). Leur fonction cellulaire se traduit par la régulation du recyclage des endosomes, la régulation de l'endocytose médiée par les récepteurs, le remodelage du cytosquelette d'actine sous-jacent à la membrane cellulaire, la propagation des cellules et le froissement des membranes. Les protéines Arfs régulent donc le remodelage de la membrane. De façon intéressante, les GAPs pour les Arfs régulent aussi le remodelage membranaire induit par la polymérisation de l'actine du cytosquelette, mais de façon partiellement indépendante de l'effet des protéines Arfs sur la membrane (Randazzo, Inoue et Bharti, 2007). En fait, les GAPs pour les Arfs agissent en protéines d'échafaudage et peuvent recruter des effecteurs et des régulateurs des GTPases Rhos. En quelque sorte, la Arf GAP sert de plateforme d'intégration des signaux cellulaires, conduisant à des changements coordonnés au niveau de la membrane et du cytosquelette d'actine, nécessaires à la migration cellulaire par exemple (Randazzo, Inoue et Bharti, 2007). La coordination des GTPases Rhos et Arfs est ici clairement démontrée.

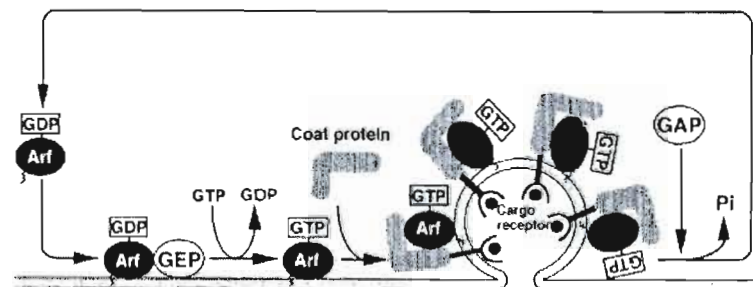


FIGURE 1-2 : CYCLE D'ACTIVATION DES GTPASES ARFS. La GTPase Arf inactive est ancrée à la membrane par sa modification lipidique, où elle pourra interagir avec sa GEF. Sous sa forme active, liée au GTP, Arf peut interagir avec les protéines du manteau et lier les récepteurs CARGO de la vésicule en formation. Arf est relarguée au cytosol suite à son inactivation par sa GAP (Takai, Sasaki et Matozaki, 2001).

### 1.1.3 LES GTPASES RHOS

Les GTPases de la sous-famille des Rhos régulent l'expression génique, mais sont surtout reconnues pour leur rôle de régulateurs de la dynamique du cytosquelette d'actine. Dans le cadre de cette étude, nous nous intéressons de plus près à la fonction, mais surtout aux mécanismes d'intégration et de régulation des GTPase Rhos. Les GTPases Rhos subissent des modifications lipidiques post-traductionnelles de type palmitoylation, géranylgeranylation et farnésylation en position C-terminale. L'interaction entre les GTPases Rhos et leurs régulateurs se déroule au niveau de la membrane. C'est par leur modification lipidique que les GTPase Rhos deviennent en mesure d'interagir avec la membrane. Dans le cytoplasme, les GTPases Rhos sont retrouvées en complexe avec une GDI Rho (Olofsson, 1999). La modification lipidique permet à ce complexe Rho- GDP/GDI d'être recruté à la membrane puis dissocié, de manière à libérer la GDI. Au niveau de la membrane, une GEF catalyse l'activité d'échange du GDP pour le GTP (Bokoch, Bohl et Chuang, 1994) et la GTPase ainsi activée peut interagir avec ses effecteurs, avant d'être inactivée par une GAP qui catalyse l'hydrolyse du GTP en GDP (Figure 1-3).

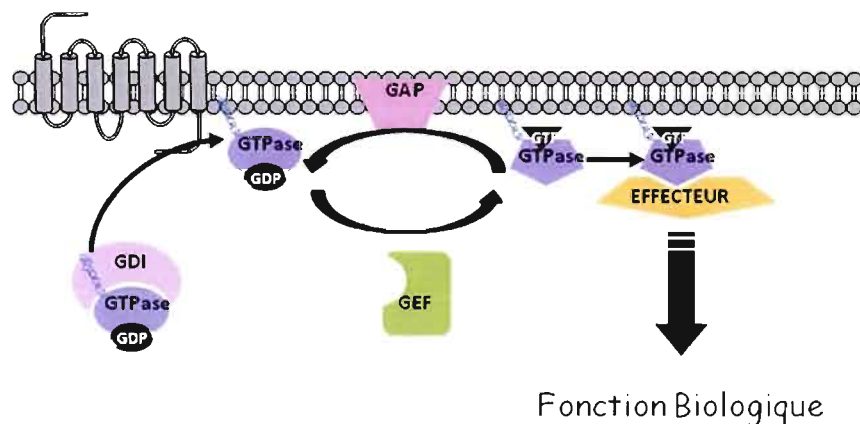


FIGURE 1-3 : CYCLE D'ACTIVATION DES GTPASES RHOS. Les GTPases Rhos sont solubles dans le cytosol grâce à leur interaction avec GDI, qui les cible à la membrane. Les GTPases Rhos seront maintenues à la membrane par leur modification lipidique, où elles pourront interagir avec leurs régulateurs. Au niveau de la membrane, la GTPase est activée par une GEF. Sous forme active, la GTPase interagira avec son effecteur pour diriger une fonction biologique.



L'activité des GTPases Rhos, qui se regroupent en 6 classes (Rho, Rac, Cdc42, Rnd, RhoD et TTF), est régulée par des signaux extracellulaires provenant de divers types de récepteurs membranaires tels que les récepteurs couplés aux protéines G, les récepteurs des cytokines, les récepteurs RTK (**R**écepteur à activité **T**yrosine **K**inase) et les récepteurs d'adhésion. Les Rhos sont activées par les GPCR (**G** protein coupled receptors) de manière GTPase-dépendante vers une sous-unité  $G\alpha$  ou  $G\beta\gamma$  (Goetzl et An, 1998). Certaines Rhos peuvent aussi être activées de manière GTPase-indépendante, par leur module protéique PDZ (domaine d'interaction à PSD95 **D**lgA **Z**onula occludens 1), qui permet une interaction directe avec le GPCR. Les GTPases Rhos peuvent être activées par une cascade hiérarchique partant de l'activation de Cdc42, suivie de l'activation de Rac, qui aboutit à l'activation de Rho (Nobes et Hall, 1995). Dans certains contextes, Ras peut mener à l'activation de Rac (Walsh et Bar-Sagi, 2001). Ras activera certains effecteurs, qui permettront l'activation séquentielle de Rac. Parmi ces effecteurs, on retrouve PI3K (**P**hosphatidylinositol **3**-kinase). Plus précisément, l'activité kinase de PI3K permet l'enrichissement des membranes en PIP3 (Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate), ce qui permet le recrutement de diverses GEF par leur domaine PH (domaine d'homologie à la pleckstrin), telles que Tiam1 (T-cell lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1), Sos (son of sevenless) et Vav (Rameh *et al.*, 1997). L'activation de ces GEF peut aussi se faire par phosphorylation, par les Tyrosine kinases de la famille Src (sarcoma). Le signal, dans ce cas, est transmis en passant soit par les récepteurs aux facteurs de croissance, soit par les intégrines. Divers régulateurs des Rhos, dont Tiam1 et OPHN1 (oligophrenine 1), interagissent respectivement avec les récepteurs au glutamate NMDAR (N-methyl-D-aspartate receptor) et AMPAR ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor) (Govek *et al.*, 2004 ; Tolias *et al.*, 2005) et transmettent les signaux cellulaires provenant de ces récepteurs en modulant l'activité de RhoA et Rac. En fait, les GTPases Rhos intègrent la multitude de signaux cellulaires provenant de ces différents récepteurs. Elles traduisent ces signaux en modulant des voies de signalisation qui mènent à la régulation de processus cellulaires complexes, tels que la migration cellulaire, qui nécessite la coordination hiérarchisée de plusieurs événements cellulaires et moléculaires.



Les Rhos sont impliquées dans une multitude de processus cellulaires qui requièrent une réorganisation coordonnée du cytosquelette d'actine : croissance axonale, excroissance des neurites, morphologie cellulaire, contraction vasculaire, trafic membranaire, adhésion cellulaire, cytokinèse, polarité et division cellulaire. De plus, durant la dernière décennie, leur implication dans la régulation de l'expression génique et de la prolifération cellulaire a été mise en évidence (Hall, 1998 ; Van Aelst et D'Souza-Schorey, 1997). Les Rhos sont impliquées dans la migration cellulaire et les mécanismes métastatiques. Elles régulent aussi l'activation de la voie JNK (c-Jun N-terminal kinases) et NFkB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), ainsi que la NADPH (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) oxydase. Par contre, les mécanismes par lesquels leurs effecteurs stimulent les réponses biologiques restent à ce jour peu détaillés. Pareillement, l'identification des effecteurs reste incomplète. Parmi leurs effecteurs les plus étudiés, on retrouve une série de kinases, PAK (p21 activated kinase), MRCK (Myotonic dystrophy kinase related Cdc42-binding kinase), PI3K, MLK (mixed lineage kinase), MLCK (Myosin light chain Kinase) et ROCK (Rho-associated protein kinase), qui participent toutes à l'organisation du cytosquelette d'actine et la transcription génique.

#### 1.1.4 INTERACTION COMMUNICATIVES ET INTÉGRATION DES SIGNAUX CELLULAIRES PAR LES GTPASES MONOMÉRIQUES

Les GTPases monomériques régulent des voies de signalisation conduisant à la traduction d'un signal en un processus cellulaire complexe qui nécessite la coordination de plusieurs GTPases. Elles jouent un rôle clé non seulement en fonction du temps, mais aussi dans la détermination spatiale des fonctions cellulaires spécifiques. Il est devenu clair que de multiples GTPases monomériques forment des cascades de signalisation qui sont impliquées dans diverses fonctions cellulaires. Les GTPases Rhos se coordonnent entre elles, par exemple pour la migration des fibroblastes par la très caractérisée cascade Cdc42/Rac-1/RhoA (Nobes et Hall, 1995). La coordination entre des GTPases de sous-familles distinctes existe aussi, par exemple la coordination des GTPases Arfs et Rabs pour le trafic vésiculaire (Nielsen, Cheung et Ueda, 2008). Dans divers processus cellulaires, tels que la régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine et le trafic membranaire, il y a

accumulation d'évidences quant à une coordination entre les GTPases Rho et Arfs (Santy et Casanova, 2002). En effet, Arf1, permettrait le recrutement de paxillin au niveau des adhésions focales, alors qu'Arf6 conduit au désassemblage des fibres de stress et la formation des lamellipodes (D'Souza-Schorey *et al.*, 1997 ; Norman *et al.*, 1998 ; Radhakrishna, Klausner et Donaldson, 1996), un ensemble de processus auxquels participent les GTPases Cdc42/Rac/RhoA. Ce type de coordination inter-famille existe aussi entre les GTPases Ras et Rho et Rab et Rho pour stimuler la prolifération et la mobilité cellulaire (Imamura *et al.*, 1998 ; Sahai, Olson et Marshall, 2001). De plus, deux GTPases monomériques distinctes peuvent réguler des fonctions cellulaires de façon coopérative ou antagoniste. L'antagonisme fonctionnel des GTPases Rac/Cdc42 versus la GTPase RhoA est bien caractérisé et se reproduit dans divers systèmes cellulaires et processus. Les GTPases Rhos et Ras, quant à elles, coopèrent par l'effecteur de Rac/Cdc42, PAK qui permet de faire converger leurs signaux en activant la voie ERK (extracellular signal regulated kinase)/MAPK (mitogen activated protein kinase). Une seule GTPase monomérique peut aussi exercer diverses réponses biologiques à travers son interaction avec différents effecteurs en aval, soit par une activation séquentielle des effecteurs, au moyen d'une localisation spécifique ou encore par la formation de plateformes de signalisation, telle la plateforme GIT/PIX, formée de régulateurs des GTPases Arfs et Rhos. Globalement, les GTPases monomériques exercent ainsi leurs fonctions en coordonnant leurs actions.

#### 1.1.5 LES GTPASES CHEZ *C. ELEGANS*

Chez l'homme, on retrouve plus de 170 GTPases de la superfamille des Ras, dont 23 GTPases Rhos (Colicelli, 2004). L'activité de ces 23 GTPases est contrôlée par 53 Rho GAPs (Peck *et al.*, 2002) et 22 Rho GEFs (Schiller *et al.*, 2006). En laboratoire, il est laborieux d'étudier la signalisation des GTPases à l'aide de modèles murins, en raison de la grande redondance fonctionnelle des GTPases chez les mammifères. Cette réalité justifie l'intérêt d'utiliser un modèle animal multicellulaire simple tel le nématode *C. elegans* pour disséquer les voies de signalisation impliquant les GTPases Rhos. Chez le nématode *C. elegans*, on retrouve 6 GTPases Rho : *rho-1*, *cdc-42*, *mig-2*, *ced-10*, *rac-2* et *crp-1*. L'état d'activation de ces GTPases est contrôlé par 13 Rho GEF (Ziel, Matus et Sherwood, 2009) et

20 Rho GAPs. Ces orthologues ne partagent pas seulement une homologie de séquences, les domaines fonctionnels aussi sont conservés sur ces protéines. Par exemple, on observe la conservation de la multimodularité des Rhos GAPs, ce qui est une indication de la conservation fonctionnelle entre l'homme et *C. elegans* (Figure 1-4). Les membres de la sous-famille des GTPases Rhos, ainsi que leurs cibles, semblent être assez bien conservés et ce, de la levure à l'homme. Cette conservation implique que les voies de signalisation et les fonctions contrôlées par ces GTPases puissent également être conservées dans l'évolution des eucaryotes. Ainsi, les études des GTPases utilisant une approche réductionniste, via l'établissement de modèles génétiquement altérables comme *Drosophila melanogaster* et *C. elegans*, devraient se révéler extrêmement utiles pour la caractérisation précise des réseaux de signalisation régulés par les GTPases, ainsi que pour la détermination de la spécificité de leurs réponses *in vivo*. D'ailleurs, l'étude des GTPases Ras dans le contexte systémique du nématode *C. elegans* nous a déjà permis d'élargir notre compréhension du réseau moléculaire complexe gouvernant l'activité de Ras. De plus, l'étude des Ras a permis de réaliser que la voie RTK-Ras-MAPK fonctionne en coordination avec d'autres voies de signalisation, afin de générer une réponse biologique appropriée (Eisenmann *et al.*, 1998 ; Gleason, Korswagen et Eisenmann, 2002 ; Moghal et Sternberg, 2003 ; Simske et Kim, 1995).

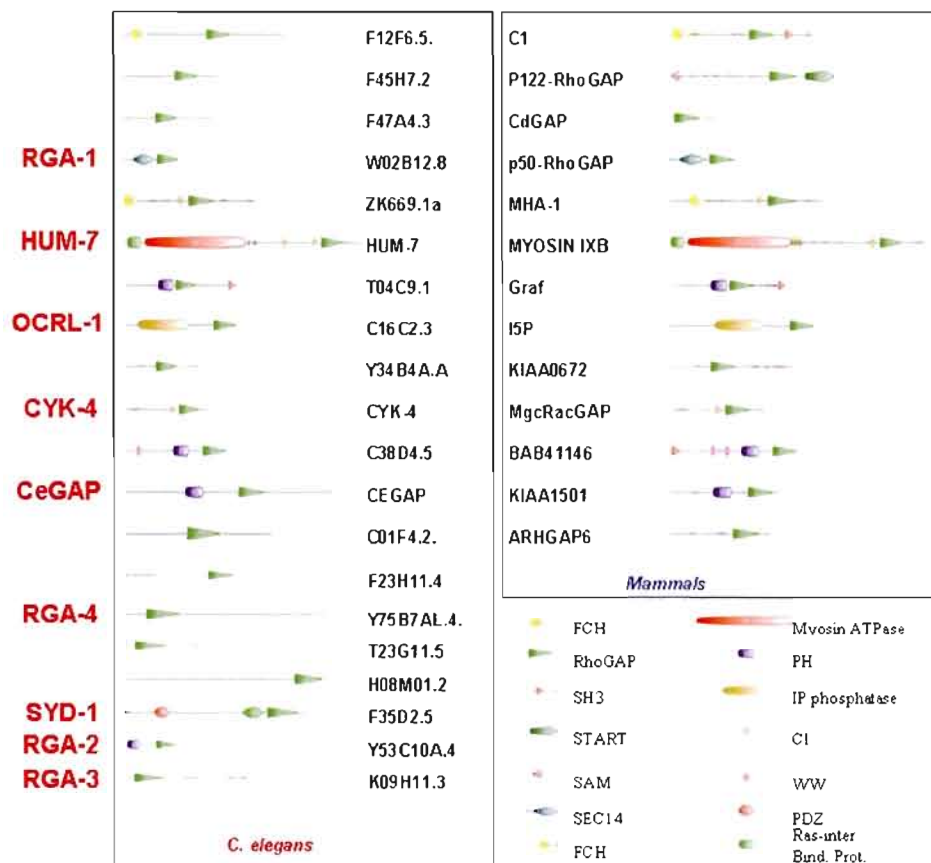


FIGURE 1-4 : CONSERVATION DES RHO GAPS ENTRE L'HOMME ET LE NÉMATODE. Les domaines protéiques sont conservés entre les Rho GAPs humaines et celles du nématode, suggérant une conservation fonctionnelle.

## 1.2 GTPASES RHOS ET DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE

### 1.2.1 LE DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE CHEZ LES MÉTAZOAIRE

L'embryogénèse est le processus par lequel un embryon se forme et se développe. Le développement embryonnaire chez les métazoaires permet d'engendrer la diversité cellulaire et l'organisation cellulaire nécessaires au développement d'un organisme fonctionnel. Ceci nécessite une régulation précise et spatio-temporelle des signaux cellulaires menant à la différenciation cellulaire et à la morphogénèse des tissus. Le développement adéquat de l'embryon nécessite que l'organisme soit en mesure de coordonner une multitude de signaux cellulaires menant à des modifications de la morphologie d'une cellule, de son adhésion et de

sa migration. Ces processus cellulaires, sont le résultat de l'intégration d'une série de mécanismes qui s'enchaînent de manière hiérarchique.

Certaines des plus importantes étapes du développement embryonnaire sont conservées à travers les phyla. Le développement des métazoaires passe donc par six étapes communes : 1) la prolifération cellulaire, 2) la différenciation cellulaire, 3) la formation de structure, qui consiste en l'agglomération des divers types cellulaires, 4) la motilité et la migration cellulaires, 5) l'apoptose et 6) la morphogenèse de l'embryon, qui parachève le développement.

La division cellulaire est étroitement liée à la différenciation cellulaire, puisque la condition requise pour la division cellulaire dépend du besoin de l'organisme pour les divers types cellulaires. De même, la détermination du destin cellulaire se poursuit parallèlement à la formation des structures cellulaires. La formation de ces structures nécessite l'organisation spatiale des divers types cellulaires afin qu'ils façonnent des tissus ou des organes. Ce processus peut s'accompagner de migration cellulaire. Bref, les étapes morphogéniques consistent en la modification de la forme de l'embryon et ou de ses organes et les GTPases Rhos sont des joueuses clés de chacun de ces événements développementaux. Par contre, cette étude se concentrera sur les événements de morphogenèse de l'embryon.

### 1.2.2 LA MORPHOGENÈSE

La morphogenèse de l'embryon résulte de modifications de la structure et des interactions cellulaires (cellules/cellules; cellules/substrat), lors de la formation des tissus et des organes. Un schéma fixe est établi au début du développement : la taille et la forme de l'organisme sont prédéterminées. Les processus morphogénétiques dépendent de la plasticité morphologique des cellules, de leurs points d'ancrage et de la communication intercellulaire.

### 1.2.3 ADHÉRENCE CELLULAIRE

Il existe deux types d'adhérence : l'adhérence intercellulaire et l'adhérence cellulaire à la matrice extracellulaire. Dans le cas de l'adhérence intercellulaire, les cellules sont liées par des jonctions serrées, des jonctions adhérentes et des desmosomes, alors que dans le second cas, les cellules sont liées à la matrice par les adhésions focales et les héli-desmosomes. Trois familles de protéines transmembranaires ont été identifiées comme responsables de l'adhésion cellulaire : les cadhérines, les intégrines et les immunoglobulines.

Les cadhérines forment une famille de glycoprotéines transmembranaires calcium-dépendante impliquée dans l'adhésion cellule-cellule et de l'adhésion cellule-matrice extracellulaire. En effet, elles sont des composantes des jonctions adhérentes et des desmosomes et se retrouvent aussi aux adhésions focales (Ashburner *et al.*, 2000 ; Barbe *et al.*, 2008). Elles sont nécessaires au bon fonctionnement cellulaire et au maintien de l'architecture cellulaire. Selon les systèmes biologiques et les cadhérines en jeu, elles régulent positivement ou négativement l'adhésion cellulaire et dans d'autres cas, favorise la migration cellulaire (Ivanov *et al.*, 2004 ; Mukoyama *et al.*, 2007). Les différents membres de la famille des cadhérines possèdent un patron d'expression tissulaire qui leur est spécifique. L'expression des cadhérines dans l'embryon est régulée de manière spatiotemporelle stricte pour coordonner une variété d'événements morphogéniques (Takeichi *et al.*, 1989). Les cadhérines modulent la ségrégation des populations cellulaires durant le développement et cette ségrégation se fonde sur les interactions homophiliques entre les cadhérines exprimées à la surface de deux cellules en contact. Cette spécificité d'adhérence qualitative fournit un mécanisme pour l'assemblage des différents types d'agrégats cellulaires.

Les intégrines forment une famille de récepteurs permettant l'interaction entre la membrane cellulaire et la matrice extracellulaire ou encore entre deux cellules. Par conséquent, tout comme les cadhérines, les intégrines sont des composantes des adhésions focales et des héli-desmosomes et ont pour ligands la fibronectine, le collagène et la laminine, trois composantes de la matrice extracellulaire, ainsi que les filaments d'actine. Les intégrines sont des régulateurs de la mobilité et de la morphogénèse cellulaires. Les connections établies entre la

matrice extracellulaire, la membrane et le cytosquelette d'actine permettent à la cellule de supporter des forces de traction, tout en restant attachée à la matrice. La création de ces connexions, entre la cellule et la matrice, est d'une importance cruciale dans les processus morphogénétiques.

Ensemble, les cadhérines et les intégrines sont responsables de l'adhérence cellulaire et coordonnent la migration cellulaire. Aux adhésions focales, on retrouve certaines cadhérines (Barbe *et al.*, 2008) et les intégrines, mais ces structures cellulaires sont, en réalité, composées de méga-complexes protéiques où on retrouve aussi, GIT-1 (G protein coupled receptor kinase-interacting protein),  $\beta$ -PIX (p21 activated kinase interacting exchange factor), PAK, la myosine (chaînes légères et lourdes),  $\alpha\beta$ -Parvin, ainsi qu'une série de kinases (FAK (focal adhesion kinase), LIMK (LIM motif-containing protein Kinase), ILK (integrin-linked kinase)) et de régulateurs des GTPases Rhos, entre autres (GO\_REF :0000023) (Ashburner *et al.*, 2000 ; Barbe *et al.*, 2008). Il existe deux types de complexes d'adhésion focaux, soit les complexes Rho-dépendants et les complexes Rac/Cdc42-dépendants. Le premier permet la formation d'adhésions focales très stables, qui supportent l'adhérence de la cellule sur son substrat. Le second permet la formation de complexes focaux, qui ont une stabilité transitoire et qui aident la cellule à avoir un point d'attachement pour générer les contractions nécessaires à sa migration. La transition entre les complexes Rhos dépendants et les complexes Rac/Cdc42 dépendant permet l'initiation de la migration ou vice versa, l'attachement de la cellule à son point d'arrivée.

L'altération de la capacité d'adhérence cellulaire peut conduire à diverses pathologies dont des troubles cardiovasculaires, des malformations, des troubles immunitaires et diverses myopathies.

#### 1.2.4 LA MIGRATION CELLULAIRE

La migration cellulaire est un processus nécessaire au développement et au maintien de l'intégrité des métazoaires. La formation des structures cellulaires (tissus et organes) découle de la motilité d'une cellule et de son déplacement dans une direction donnée vers son



emplacement définitif. La motilité cellulaire est donc initiatrice de nombreux processus morphogénétiques durant l'embryogénèse.

La migration cellulaire est un processus dynamique et cyclique. La cellule migrante cycle d'un état d'adhérence à un état d'extension, suivi d'un état de contraction et d'une ré-adhérence (Figure 1-5). Ce cycle se répète jusqu'à l'atteinte de l'emplacement définitif. La cellule adhérente est liée à son substrat qu'est la matrice extracellulaire et migre vers les complexes d'adhérence focale, qui incluent les intégrines. Les intégrines sont le lien entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette d'actine, par leurs interactions avec des complexes protéiques, eux-mêmes associés à l'actine. Elles sont adressées à la membrane saillante (avant de la cellule) et, quand elles se retrouvent à l'arrière, elles sont endocytées et recyclées pour être ciblées à nouveau à la membrane saillante. La migration de la cellule est amorcée par l'extension de filopodes/lamellipodes, qui sont une projection du cytosquelette d'actine à l'extrémité mobile de la cellule en migration. Lors de l'étape d'extension, il y a polymérisation locale de l'actine par l'action d' Arp2/3 (Nuclear actin-related protein 2/3), qui sert de site de nucléation pour les nouveaux filaments d'actine, ce qui crée le mouvement de la membrane. Les lamellipodes sont riches en micro-filaments d'actines et ces derniers, lorsqu'ils s'étendent, s'attachent au substrat qu'est la matrice extracellulaire, au moyen des sites d'ancrage temporaires, les complexes d'adhésion focale, toujours par l'interaction des intégrines avec la matrice. Il s'agit de l'étape de ré-adhérence. Cette étape est suivie d'une contraction de l'appareil actine-myosine, qui permet la translocation de la cellule (cytoplasme et organelles) vers la partie saillante de la membrane. Finalement, la libération des connexions adhésives à l'arrière de la cellule et la rétraction de la queue terminent le cycle. (Figure 1-5).



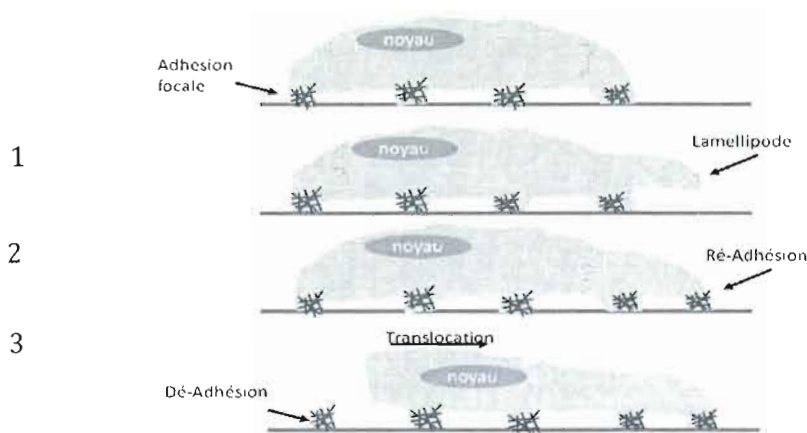


FIGURE 1-5 : LES ÉTAPES DE LA MIGRATION CELLULAIRE. La migration cellulaire s'effectue en 3 étapes. Elle est initiée par la formation de protubérances filopode/lamellipode à l'avant de la cellule. Elle est suivie d'une adhérence de ces protubérances et se termine par une dé-adhésion, qui est en fait une rétraction de l'arrière de la cellule.

Cette cascade d'évènements conduisant à la motilité cellulaire est très bien caractérisée et implique les GTPases de la sous-famille des Rhos. Cdc42 promeut la formation de filopodes, qui sont en fait de minces projections cytoplasmiques, qui s'étendent jusqu'à la pointe des cellules en migration. Cdc42 favorise aussi l'activation de Rac, qui régule la formation des lamellipodes. Les lamellipodes contiennent un maillage d'actine bidimensionnelle, qui permet à la structure toute entière de la cellule de se mouvoir sur son substrat. Rac stimule ensuite l'activation de Rho. Rho régule la formation de fibres de tension. Les fibres de tension sont des structures d'ordre élevé dans les cellules et se composent de filaments d'actine, de protéines de réticulation et de myosine de type II. Les fibres de tension sont ancrées à la membrane de la cellule et les sites de cet ancrage sont également reliés à des structures de la matrice extracellulaire. Ces sites sont appelés les complexes d'adhérence focale. Donc, Rac et Cdc42 favorisent la migration par la polymérisation d'actine à l'extrémité saillante de la membrane, alors que Rho favorise la contraction de l'appareil d'actine-myosine, suite à la ré-adhérence de par son effet sur l'activité de la myosine II par l'activation de ROCK (Figure 1-6). Cette contractilité favoriserait de surcroît la dissolution des complexes d'adhésion focale transitoire à l'arrière de la cellule et permet de perpétuer le cycle de la migration (Lauffenburger et Horwitz, 1996). Concomitamment, Rho permet la formation de complexes d'adhésion focale stables et durables, ce qui avantage la fixation des

cellules à la matrice extracellulaire. De manière intéressante, durant la migration cellulaire, Rho est exclusivement localisée à l'arrière de la cellule, alors que Rac et Cdc42 sont localisées à la membrane saillante (Lauffenburger et Horwitz, 1996 ; Nobes et Hall, 1995).

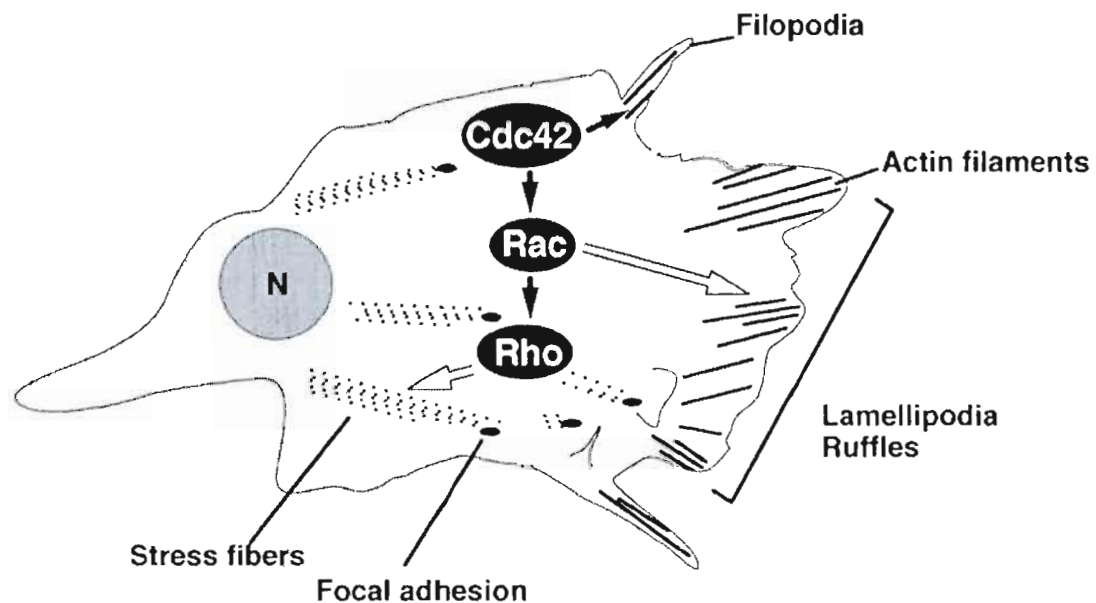


FIGURE 1-6 : LA CASCADE DE SIGNALISATION PAR LES GTPASES AU COURS DE LA MIGRATION CELLULAIRE. Dans une cellule en migration, la GTPase Cdc42, est active à la membrane saillante et permet la formation de filopodes. Cdc42 activera Rac à la membrane saillante qui permettra l'accumulation de filaments d'actine et la formation des lamellipodes. Simultanément à l'arrière de la cellule, Rho favorisera la formation de fibres de stress, qui permettent la contraction et l'avancement de la cellule. Tiré et adapté de (Takai, Sasaki et Matozaki, 2001)

Il a été mentionné que, lors de la migration cellulaire, le trafic vésiculaire de certains récepteurs, tels que les intégrines, joue un rôle important. Il est aujourd'hui clairement démontré que le recyclage des molécules d'adhésion est important pour la formation des membranes saillantes et la migration cellulaire. De plus, la composition des membranes en avant et en arrière de la cellule en migration diffère, ce qui entraîne une régulation particulière du trafic vésiculaire durant la migration cellulaire.

Vu le rôle capital des GTPases Rhos dans la migration cellulaire et leur activation spatio-temporelle qui semble être essentielle à ce processus, il n'est pas surprenant que des mutations des GTPases ou de leurs régulateurs soient responsables de pathologies telles que le diabète, les déficits immunologiques, la microphthalmie, etc.

### 1.3 GTPASE RHOS ET LE RETARD MENTAL

#### 1.3.1 LE RETARD MENTAL

Le retard mental (RM) est une déficience globale des capacités cognitives d'un individu qui se caractérise par un quotient intellectuel inférieur à 70 (Ramakers, 2002). Le RM est associé à une altération de la structure et de la densité des épines dendritiques (Blanpied et Ehlers, 2004). L'altération résulte d'un déséquilibre des voies de signalisation contrôlant la formation des synapses (synaptogenèse) et la modulation de l'efficacité de la transmission synaptique (plasticité synaptique (PS)). Ces mécanismes dépendent de l'activation de récepteurs au niveau des synapses, tels les récepteurs du glutamate (mGluR (metabotropic glutamate receptor), NMDAR, AMPAR), les récepteurs ephrin (Eph) et dopamine (DOP) entre autres (Bourgin *et al.*, 2007 ; Lau et Zukin, 2007 ; Malinow et Malenka, 2002 ; Murai *et al.*, 2003). Au niveau macro-anatomique, des études neuro-pathologiques ont montré que le RM est associé à des altérations de la structure du cortex cérébral et de l'hippocampe. Les formes de RM les plus sévères sont associées à des malformations du cerveau et à la microcéphalie (Dierssen et Ramakers, 2006), ainsi qu'à une réduction du nombre de neurones. Dans certains cas, le RM peut résulter d'une migration anormale des neurones du cortex cérébral. Ces altérations entraînent une réduction significative du réseau d'interconnexion du cerveau. Les formes légères de RM se caractérisent plutôt par une pathologie au niveau des dendrites (Kaufmann et Moser, 2000). En fait, ce type de RM dépend de l'altération de la connectivité neuronale (Purpura, 1974). La caractéristique du RM non-spécifique est une réduction de la densité des épines dendritiques et une prédominance des épines dendritiques longues et minces, aux dépens des épines dendritiques matures présentant une morphologie de champignon au niveau de l'hippocampe et du cortex cérébral. Cette corrélation entre la forme, la densité, le développement de l'arbre dendritique et le RM a été montrée pour les

syndromes de Down, du X fragile, de Rett, de Williams et de Rubinstein-Taybi (Armstrong *et al.*, 1995 ; Guidi *et al.*, 2008 ; Pfeiffer et Huber, 2007 ; Pogacar, Nora et Kemper, 1973), ainsi que pour les formes de RM non-spécifiques (Kaufmann et Moser, 2000). Les troubles de la régulation de l'activité synaptique et de la morphogenèse des épines dendritiques semblent donc être liés à des mutations de gènes en cause dans la pathologie du RM (Figure 1-7).

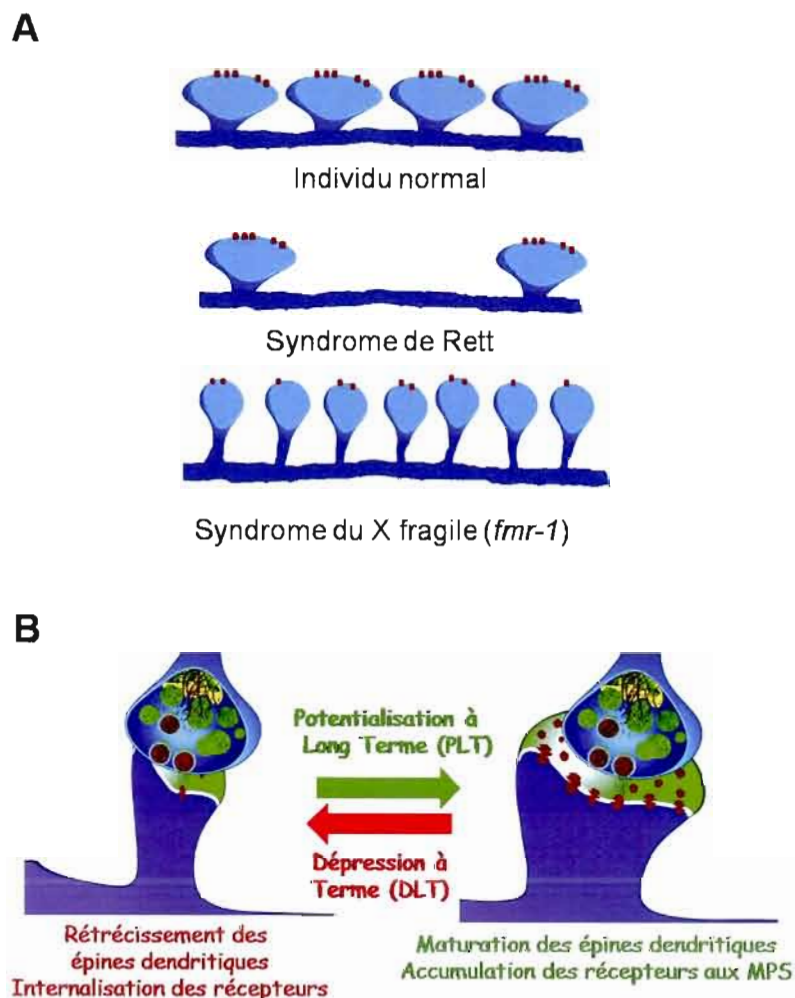


FIGURE 1-7 : PATHOLOGIES DENDRITIQUES ET RETARD MENTAL. A) Le syndrome de Rett se caractérise par une accentuation de la DLT au niveau des neurones de l'hippocampe et à une diminution de la densité des épines dendritiques. Le syndrome du X fragile se caractérise par une augmentation de la densité d'épines dendritiques longues et fines au niveau des neurones de l'hippocampe et du néocortex. B) L'établissement de la PLT est associé à une augmentation de l'efficacité de transmission synaptique au niveau des neurones de l'hippocampe, à la maturation des boutons post-synaptiques qui adoptent une morphologie en forme de champignon, l'accumulation des récepteurs au glutamate au niveau

des membranes post-synaptiques et à la création de nouvelles synapses (synaptogenèse). L'établissement de la DLT est associé aux processus cellulaires inverses. Tiré de (Harel et Jenna, 2010)

### 1.3.2 LE SIÈGE DE LA COGNITION

La cognition correspond à la capacité d'un individu à apprendre par le traitement et l'intégration de l'information mémorisée et disponible dans son environnement. Le séquençage du génome humain a permis d'identifier plus de 300 gènes responsables du retard mental chez l'homme. Les études anatomiques des cerveaux de gens atteints de retard mental, une pathologie caractérisée par un déficit cognitif, ont permis d'identifier que l'hippocampe, mais aussi le cortex cérébral sont structurellement altérés dans la majorité des cas de retard mental : diminution du nombre de synapses, diminution du nombre de neurones, migration et développement neuronal altérés. D'ailleurs, l'hippocampe et le cortex cérébral sont aujourd'hui largement reconnus comme le siège de la cognition. Leurs altérations entraînent, entre autres, une réduction du réseau d'interconnexions du cerveau. L'établissement de la cognition et de la mémoire, ainsi que l'acquisition de nouveaux apprentissages, sont régis par différentes régions du cerveau et dépendent des connections entre ces différentes régions. L'hippocampe est le siège de la mémoire spatiale, la mémoire de reconnaissance et la mémoire à court terme (Lynch, 2004). Le cortex est, quant à lui, responsable de la mémoire spatiale et de la mémoire à court terme, mais aussi des mémoires sensorielles (visuelle, tactile, gustative, et auditive) (Morris *et al.*, 1990). Le cervelet participe aux apprentissages par conditionnement et à l'apprentissage des habiletés motrices (Pascalis et Bachevalier, 1999 ; Squire, Amaral et Press, 1990). La cognition dépend donc non seulement de l'intégrité de ces régions du cerveau, mais aussi de l'intégrité du réseau d'interconnexion de ces régions.

### 1.3.3 LA PLASTICITÉ SYNAPTIQUE ET LA COGNITION

La plasticité synaptique (PS) consiste en la propension d'une synapse à moduler l'efficacité de transmission synaptique. La transmission synaptique est une mesure de la communication entre l'axone et les dendrites (Richter et Klann, 2009), reflétant ainsi l'ampleur de ces connections synaptiques. La transmission synaptique peut être modifiée par la fréquence et la durée de stimulation des synapses. La PS dépend donc de processus moléculaires et cellulaires permettant une optimisation de l'efficacité de transmission synaptique, qu'on appelle aussi la potentialisation à long terme (PLT) ou encore une dépréciation de l'efficacité de transmission synaptique, soit la dépression à long terme (DLT). L'équilibre entre la PLT et la DLT est sous-jacent à l'établissement de la cognition. Pour découpler l'efficacité de transmission synaptique, l'augmentation de la réceptivité de la cellule post-synaptique aux signaux provenant de la cellule pré-synaptique est nécessaire (Malenka et Bear, 2004). La PLT permet cette amélioration de la réceptivité de la cellule post-synaptique aux neurotransmetteurs en augmentant le nombre et l'activité des récepteurs glutamatergiques à la surface de sa membrane (Malenka et Bear, 2004). La DLT résulte, quant à elle, d'une diminution de la densité des récepteurs glutamatergiques à la membrane post-synaptique et possiblement d'une diminution du largage des neurotransmetteurs dans la fente synaptique. Plusieurs formes de RM sont associées à une altération de la morphologie des épines dendritiques (Kaufmann et Moser, 2000). En effet, la PLT et la DLT peuvent entraîner l'altération de la morphologie des épines dendritiques. La morphologie des épines dendritiques est importante pour une efficacité de transmission optimale, puisque le volume d'une épine dendritique est proportionnel à l'aire de la synapse, au nombre de récepteurs post-synaptiques et au nombre de vésicules pré-synaptiques larguées dans la fente synaptique (Nusser *et al.*, 1998 ; Schikorski et Stevens, 1997). La PS inclut aussi des modifications structurales de l'arbre dendritique, qui entraînent soit une augmentation ou une diminution du nombre total de synapses (Chklovskii, 2004 ; Dillon et Goda, 2005). Ainsi, il a été montré que la PLT stimule la formation de nouvelles épines dendritiques pour les neurones recevant la stimulation (Engert et Bonhoeffer, 1999). La cognition dépend donc de l'équilibre entre le développement de nouvelles synapses et la suppression de synapses existantes. L'ensemble



de ces processus de plasticité synaptique constitue la base cellulaire de la cognition et des apprentissages.

#### 1.3.4 LES VOIES DE SIGNALISATION CONTRÔLANT LA PLASTICITÉ SYNAPTIQUE

Deux types de voies de signalisation sont sollicités dans la plasticité synaptique, soit une voie rapide et une voie lente. La voie lente entraîne l'initiation de la transcription et/ou de la traduction de certains gènes importants pour la consolidation de la PLT. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs de la transcription et de la traduction interrompt la consolidation de la PLT (Ran *et al.*, 2009). De plus, des études ont exposé que l'on retrouvait des ribosomes, des facteurs de traduction et des ARNm dans le corps cellulaire des neurones, mais aussi au niveau des synapses et des dendrites (Sutton et Schuman, 2006 ; Zhong, Zhang et Bloch, 2006). Ces données suggèrent fortement qu'une synthèse locale de protéines puisse aussi être responsable de l'établissement d'une plasticité synaptique soutenue. Par corrélation, l'établissement de la mémoire à long terme nécessite aussi la consolidation et le maintien des changements induits par la PLT. Plusieurs gènes identifiés dans des formes non-syndromiques de retard mental codent pour des protéines jouant un rôle dans la régulation de la transcription ou encore dans la régulation de la synthèse locale de protéines (Figure 1-8). Les principales voies comprennent, entre autres, FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein), une protéine affine de l'ARNm, responsable du syndrome de l'X Fragile (Huber *et al.*, 2002), et NF1 (neurofibromin 1), une protéine responsable du retard mental chez les patients souffrant de neurofibromatose de type-1. NF-1 est une GAP pour Ras et régule négativement la voie ERK/MAPK qui conduit à la transcription de gènes codant pour des protéines connues pour leur rôle dans la plasticité et la morphologie synaptiques (Trovo-Marqui et Tajara, 2006). D'autres membres de la cascade ERK/MAPK ont été identifiés pour être responsables de forme de retard mental syndromique, comme RSK2 (Ribosomal S6 protein kinase 2) et CBP (Creb binding protein), qui sont respectivement en cause dans le syndrome de Coffin Lowry et de Rubinstein-Taybi (Petrij *et al.*, 1995 ; Trivier *et al.*, 1996). En fait, RSK2 et CBP se dissocient suite à la phosphorylation de RSK2 par ERK et sont transloqués au noyau, où ils promeuvent l'ouverture de la chromatine et favorisent ainsi la

transcription génique (Chrivia *et al.*, 1993 ; Sassone-Corsi *et al.*, 1999). FMRP régule le transport et la stabilité des ARNm et sa liaison aux ARNm réprime la traduction de ces ARNm au niveau des synapses et des dendrites (Laggerbauer *et al.*, 2001). Par exemple, FMRP a été mise en évidence pour lier l'ARNm de Rac et inhiber sa traduction (Schenck *et al.*, 2003). De façon intéressante, PAK est un effecteur de Rac qui mène à l'activation de la voie ERK/MAPK (Meng *et al.*, 2005) et qui interagit physiquement avec FMRP (Hayashi *et al.*, 2007). PAK est aussi concernée dans la pathologie du retard mental et son inactivation par des inhibiteurs chimiques restaure le phénotype sauvage chez le modèle de souris pour le syndrome du X fragile (KO pour FMRP) (Hayashi *et al.*, 2007). PAK est une protéine qui joue un rôle pivot dans la plasticité synaptique, puisqu'elle est comprise dans la régulation de la transcription dans les événements de plasticité synaptique soutenue, mais aussi dans la régulation d'événements plus dynamiques, tels que la réorganisation du cytosquelette d'actine.

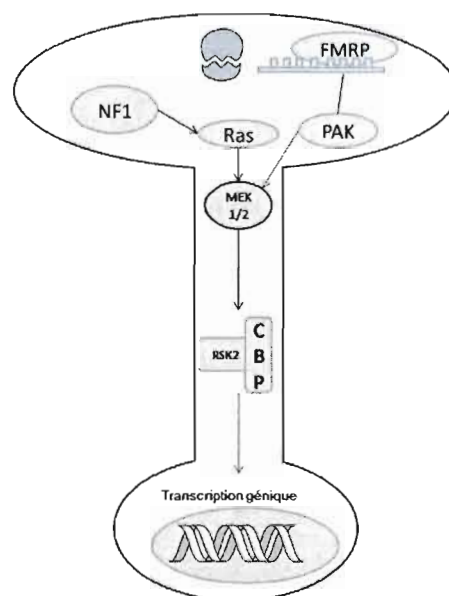


FIGURE 1-8 : LA VOIE LENTE MENANT À LA CONSOLIDATION DE LA PLT. L'établissement d'une plasticité synaptique soutenue implique des voies de signalisation et des protéines ayant un rôle dans la régulation de la transcription et de la traduction.



La voie rapide est, quant à elle, responsable de modifications instantanées et non persistantes, telles que le remodelage du cytosquelette d'actine et l'adressage des récepteurs au glutamate à la membrane post-synaptiques, qui corréleront avec l'initiation de la consolidation de la PLT et l'établissement de la mémoire à court terme. La voie rapide nécessite l'activation rapide du protéome synaptique. Le rôle de PAK dans la régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine a été mentionné précédemment et suggère l'implication des GTPases Rho dans ces processus de plasticité synaptique à court terme. En effet, les GTPases de la sous-famille des Rho sont reconnues pour leur fonction dans la régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine, mais aussi dans le trafic vésiculaire des récepteurs. Il est intéressant d'observer que certaines composantes de la voie lente sont aussi présentes dans la voie rapide (Figure 1-7 et 1-8), soit PAK, mais aussi NF1 et Ras qui peuvent stimuler l'activation des GTPases Rho, directement ou en activant leur GEF spécifique (Figure 1-9). Les GTPases Rho, dont Rac-1, Cdc42 et Rho-1, participent à la réorganisation du cytosquelette d'actine et plusieurs de leurs régulateurs ont été identifiés dans la pathologie du RM (Ramakers, 2002).

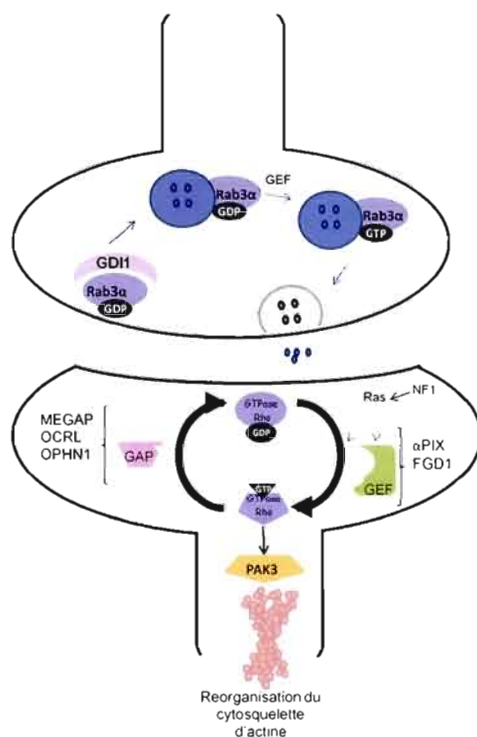


FIGURE 1-9 : LA VOIE RAPIDE MENANT À L'INITIATION DE LA PLT. Les modifications instantanées et non persistantes conduisant à l'initiation de la PLT passent par la régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine, un processus sous le contrôle des GTPases Rhos.

### 1.3.5 IMPLICATION DES GTPASES MONOMÉRIQUES ET RETARD MENTAL

Le séquençage du génome humain a facilité l'identification des gènes responsables du RM. Parmi eux, plusieurs sont des régulateurs ou des effecteurs des petites protéines G (Figure 1-10). Entre autre, oligophrenin 1, une GAP pour RhoA ((Billuart *et al.*, 1998); α-PIX et FGD-1, deux GEF de Rac et Cdc42, (Estrada, Caron et Gorski, 2001 ; Kutsche *et al.*, 2000 ; Zheng *et al.*, 1996), PAK3, une kinase effectrice de Rac/Cdc42 (Bagrodia *et al.*, 1995), MEGAP et OCRL1 des GAPs de Rac et Cdc42 (Endris *et al.*, 2002 ; Faucherre *et al.*, 2003). D'autres régulateurs de la superfamille des Ras ont aussi été identifiés : TSC2 est une GAP de Rap1 et Rab5 (Wienecke, Konig et DeClue, 1995 ; Xiao *et al.*, 1997), NF1, une GAP de Ras (Gutmann, Wood et Collins, 1991) et GDI1, un GDI des GTPases Rab (Bachner *et al.*, 1995). La machinerie de régulation des petites protéines G est donc vivement sollicitée dans la

morphogenèse des épines dendritiques et la plasticité synaptique chez les mammifères. Elles contrôlent les voies de signalisation qui maintiennent l'équilibre entre PLT et la DLT, entre la synaptogenèse et l'élitage des synapses et ce en aval des récepteurs NMDAR, AMPAR, mGluR, EphR, Notch, Dopamine et FGFR (fibroblast growth factor receptor). Ces voies de signalisation contrôlent l'accumulation d'AMPArs et des protéines associées à la membrane post-synaptique, l'activation de la traduction locale, ainsi que la morphologie des épines dendritiques et des synapses, grâce au contrôle du remodelage du cytosquelette d'actine (Figure 1-10).

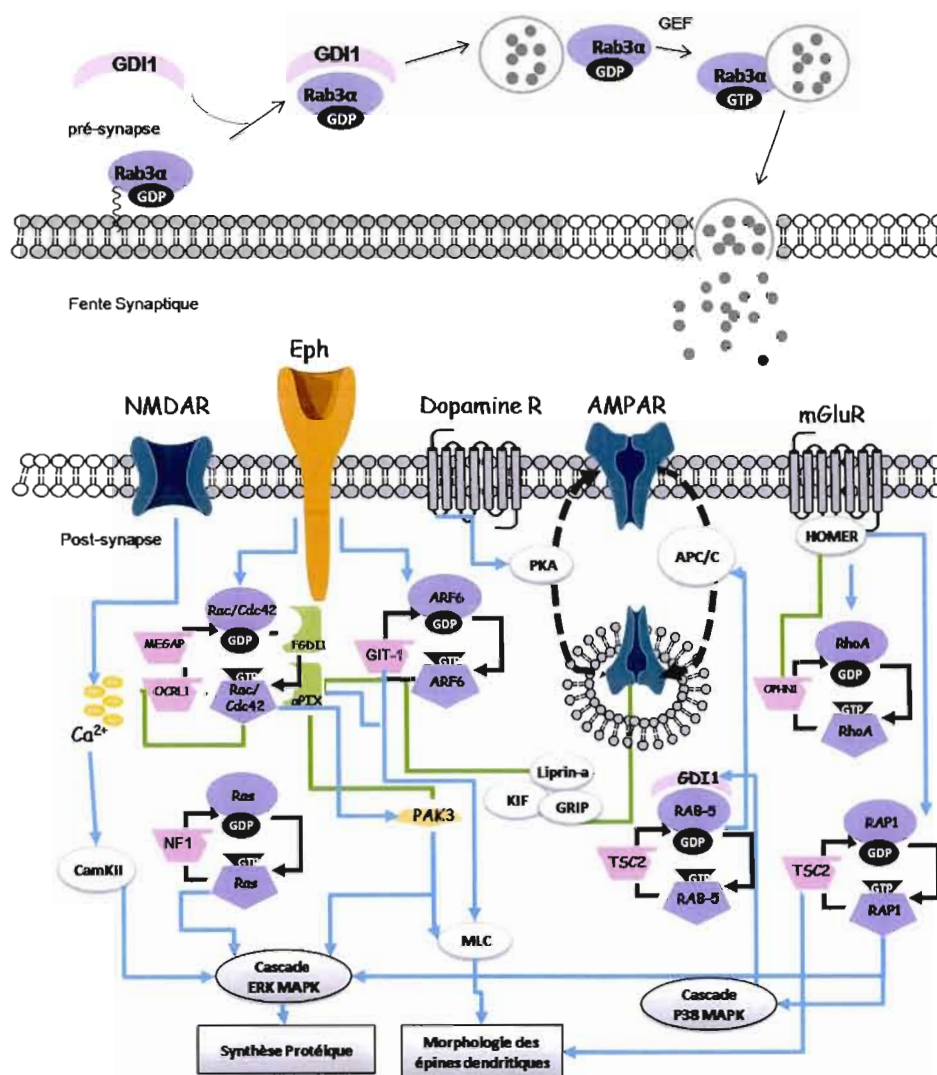


FIGURE 1-10 : LES GTPASES MONOMÉRIQUES ET LE RETARD MENTAL. Sont représentées les GTPases identifiées pour leur implication dans la pathologie du retard mental (en bleu) ainsi que leurs régulateurs, les GAP (en rose) et les GEF (en vert).

### 1.3.6 GTPASES RHOS ET PLT / DLT

La consolidation de la PLT, comme mentionné précédemment, se produit en deux phases : une phase initiale (consolidation rapide), d'une durée de 10 à 30 minutes, et une phase lente (consolidation tardive), qui nécessite la synthèse de nouvelles protéines. La phase initiale suit l'induction de la PLT qui cause l'apparition d'actine-F (actine filamenteuse) et,

subséquentement, une modification cyto-architecturale de l'épine dendritique et de la synapse. Des études récentes ont souligné l'importance de l'intégrité du cytosquelette pour le maintien et l'établissement de la PLT. L'utilisation d'agents bloquant la polymérisation de l'actine a pour effet de déstabiliser l'établissement de la PLT (Krucker, Siggins et Halpain, 2000). Alors, l'hypothèse selon laquelle les GTPases Rho pourraient avoir un rôle direct dans l'établissement de la PLT et, donc, de la mémoire à long terme est extrêmement plausible vu leur rôle central dans la régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine. Ce n'est que très récemment qu'un lien direct entre la signalisation par les GTPases Rhos et la PLT fut établi. Il a été démontré que l'induction de la PLT active une voie de régulation de l'actine et altère la morphologie des synapses des épines dendritiques recevant le signal dans un système de culture de cellules de l'hippocampe (Chen *et al.*, 2007). Dans cette étude, il a été montré que le nombre d'épines dendritiques exprimant PAK phosphorylé et Cofilin phosphorylé, une cible de PAK impliquée dans la réorganisation du cytosquelette d'actine, est augmenté et que ces épines ont des synapses plus larges et une morphologie en champignon offrant une surface plus importante. Ces données montrent le rôle de PAK dans la stabilisation de la PLT et l'importance de la morphologie en champignon pour la consolidation de la PLT. PAK étant un effecteur connu des GTPases Rho, Rac et Cdc42, il ne manque qu'un lien pour confirmer l'implication de la signalisation des GTPases Rhos dans l'établissement de la PLT. Très récemment, une étude a démontré l'implication de deux voies de signalisation nécessaires à la consolidation de la PLT (Rex *et al.*, 2009). La première voie est régulée par RhoA, qui mène à l'activation de ROCK, une kinase effectrice de Rho, qui phosphoryle Cofilin et qui promeut la réorganisation du cytosquelette d'actine. La seconde voie implique Rac et PAK, qui stabiliseront les filaments d'actine nouvellement formés. Les mécanismes de régulation de la morphologie et de la connectivité de l'arbre dendritique dépendent donc de la dynamique du cytosquelette d'actine, qui est elle-même régulée par les GTPases Rhos. La modulation de l'activité des GTPases Rhos a donc un effet direct sur le réarrangement du cytosquelette d'actine, sur l'augmentation de la neurotransmission et de la plasticité synaptique, ainsi que sur l'amélioration des capacités cognitives (apprentissage et mémoire) (Diana *et al.*, 2007). En fait, le maintien de l'équilibre entre la PLT et la DLT permet le développement, la maturation et les modifications morphologiques des épines dendritiques,

en plus de l'augmentation du nombre de récepteurs à la membrane post-synaptique. Il s'agit d'un ensemble de processus cellulaires connus pour être régulés par les GTPases Rhos.

### 1.3.7 GTPASES RHOS ET FORMATION/MORPHOLOGIE DES ÉPINES DENDRITIQUES ET DES SYNAPSES

Une des caractéristiques des patients souffrant de RM est la structure et la morphologie altérées des dendrites et des synapses de leurs neurones (Kaufmann et Moser, 2000). Les épines dendritiques et les synapses sont très plastiques et sont capables de modifier leur morphologie de manière très dynamique. Un défaut de la régulation du cytosquelette d'actine peut, par conséquent, affecter la dynamique sous-jacente à ces modifications structurales et morphologiques nécessaires au développement des connexions neuronales. Les GTPases Rhos sont des régulateurs clés de cette dynamique. L'utilisation de mutants dominants négatifs (DN) ou constitutivement actifs (CA) des différentes GTPases a souligné que le déséquilibre, dans un sens comme dans l'autre, conduit à une altération structurale et morphologique des dendrites et des synapses (Govek, Newey et Van Aelst, 2005). Ceci souligne l'importance de la succession cyclique d'activations et d'inactivations des GTPases dans le contrôle de la plasticité synaptique (Govek, Newey et Van Aelst, 2005). De cette manière, les régulateurs GEF et GAP de ces GTPases sont d'une importance capitale dans le contrôle de ces processus. Il a été montré à maintes reprises que RhoA, dont l'activité est régulée par la GAP OPHN1, engendre un effet négatif sur le développement de l'arbre dendritique, dans différents modèles expérimentaux tels que les cellules du ganglion de la rétine de *Xenopus* (Ruchhoeft *et al.*, 1999), les neurones chez la *Drosophile* (Lee *et al.*, 2000), ainsi que les neurones hippocampiques de rats et de souris (Ahnert-Hilger *et al.*, 2004 ; Pilpel et Segal, 2004). Cet effet est concilié par l'activation de la kinase effectrice ROCK (Riento et Ridley, 2003). RhoA est aussi impliqué dans la morphogenèse des épines dendritiques. Des mutants de RhoA constitutivement actifs (CA) ont permis de mettre en évidence son rôle négatif sur la formation et le maintien des épines dendritiques des neurones de l'hippocampe (Nakayama, Harms et Luo, 2000). La réduction de l'expression d'OPHN1 récapitule les effets de RhoA CA, alors que l'inhibition de ROCK, l'effecteur de RhoA, permet de rétablir la morphogenèse normale. Ceci suggère que l'effet de RhoA et OPHN-1,

sur la morphologie des épines dendritique et la structure de l'arbre dendritique, est dû en partie à une régulation altérée du cytosquelette d'actine (Govek *et al.*, 2004). Rac et Cdc42, telles que mises en évidence dans d'autres systèmes cellulaires (ex. : fibroblaste), ont aussi une fonction antagoniste à Rho. L'effet de Rac/Cdc42 CA et de Rac/Cdc42 DN est contraire aux effets de RhoA CA et DN. Ainsi, l'activité de Rac et Cdc42 est nécessaire à la formation et au maintien des épines dendritiques (Nakayama, Harms et Luo, 2000), tout comme elle est un important déterminant de la structure de l'arbre dendritique à l'égard des branchements et du remodelage. Tiam1, une GEF de Rac, stimule la formation des épines dendritiques et l'élaboration d'un arbre dendritique complexe au niveau des neurones de l'hippocampe (Tolias *et al.*, 2005). PIX, une GEF pour Cdc42, participe aussi à la morphogenèse et la formation des dendrites (Zhang *et al.*, 2005). Cette GEF est recrutée par GIT aux protrusions des synapses en formation (Bagrodia *et al.*, 1999 ; Zhang *et al.*, 2005). PAK est l'effecteur principal qui traduit les signaux cellulaires provenant de Rac et Cdc42, vers le cytosquelette d'actine (Kreis et Barnier, 2009).

### 1.3.8 GTPASES RHOS ET TRANSPORT VÉSICULAIRE

Les GTPases Rhos régulent de nombreuses étapes du trafic vésiculaire. Elles régulent l'endocytose clathrine-dépendante, mais aussi la macropinocytose, la phagocytose, l'exocytose, ainsi que le trafic de divers récepteurs. Entre autres, les GTPases Rhos pourraient affecter l'endocytose clathrine-dépendante par leur action sur le cytosquelette d'actine. En effet, la dynamique du cytosquelette d'actine et la contractilité de l'appareil d'actine-myosine participent à diverses étapes du processus d'endocytose, telles que l'invagination de la membrane, la dissolution de l'actine corticale et la fission des vésicules du manteau (Ridley, 2006 ; Symons et Rusk, 2003). La localisation des GTPases Rhos à différentes membranes peut justifier leurs fonctions disparates aux étapes distinctes du trafic des récepteurs. Hypothétiquement, cette fonction des GTPases dans le trafic vésiculaire passerait par la coordination de la dynamique du cytosquelette d'actine et les interactions communicatives avec les GTPases des autres familles, dont les Arfs et les Rabs. Le lien entre les GTPases Rhos, le cytosquelette d'actine et le trafic des récepteurs n'a jamais été démontré clairement. Par contre, il a été montré que le trafic du récepteur au glutamate AMPA



nécessite la dynamique du cytosquelette d'actine (Bredt et Nicoll, 2003) et que Rac1 peut induire l'adressage et l'accumulation des récepteurs au glutamate AMPA aux membranes post-synaptiques (Wiens, Lin et Liao, 2005). RhoA a aussi été proposée pour réguler le trafic de certains canaux ioniques neuronaux (Stirling, Williams et Morielli, 2009). Le rôle des GTPases Rhos dans le trafic des récepteurs neuronaux suggère leur implication directe dans les événements de plasticité synaptique.

#### 1.4 PIX GIT ET PAK: UNE PLATEFORME DE SIGNALISATION

Les GTPases Rhos régulent une abondance de processus cellulaires. Il a été mentionné précédemment qu'elles sont impliquées dans les événements de plasticité synaptique et dans les événements morphogénétiques durant le développement embryonnaire. Parmi les protéines, régulatrices et effectrices des GTPases Rhos, nous remarquons que le complexe GIT/PIX/PAK est redondant dans ces processus. Il a été mis en évidence que le complexe PIX/GIT/PAK régule les cascades de signalisation par le contrôle de l'activité des GTPases Rhos. L'étude de la machinerie de régulation des GTPases Rhos est par conséquent d'un grand intérêt. Notre étude visait l'élucidation de la fonction d'une plateforme de signalisation, composé de PIX/GIT/PAK, chez le nématode *Ceanorhabditis elegans*. La fonction de ces gènes chez le nématode, à ce jour reste mal définie. Afin de comprendre la direction que cette étude a prise, il est primordiale de faire une revue des connaissances acquises à ce jour sur la fonction de ce complexe dans d'autres systèmes (mammifères). Pour cette étude, nous nous sommes intéressés de plus près à la fonction de PIX et PAK qui forment un complexe de signalisation avec GIT-1. Ces protéines sont responsables de diverses pathologies humaines. La dissection des voies de signalisation impliquant le complexe de signalisation PIX/GIT/PAK, devrait permettre d'élargir nos connaissances sur les mécanismes pathologiques liés aux mutations de GIT-1,  $\alpha\beta$ -PIX et PAK-1/3 chez l'humain, donc, d'élucider en partie la fonction de ces protéines dans le développement animal.



#### 1.4.1 PAK

PAK1 et PAK3 sont deux kinases, activées par p21 (**p**21 **a**ctivated **k**inase) et retrouvées respectivement sur les chromosomes 11 et X, chez l'homme. PAK1/3 sont les effecteurs principaux des GTPases Rhos, conduisant le signal cellulaire entre celles-ci et régulant le cytosquelette d'actine, ainsi que la cascade des MAP kinases. En effet, PAK1/3 sont des sérine thréonine kinases impliquées dans la communication cellulaire, la dynamique du cytosquelette d'actine, la mobilité cellulaire, la progression du cycle cellulaire et la mort/survie cellulaire (Bokoch, 2003). Chez les mammifères, PAK1/3 agissent aussi dans la morphogenèse des épines dendritiques, la formation de synapses, la différenciation neuronale et divers événements de plasticité synaptique (Boda *et al.*, 2006 ; Govek, Newey et Van Aelst, 2005). PAK1/3 sont toutes deux exprimées dans le cerveau, plus précisément dans le cortex et l'hippocampe, ainsi que dans le tissu musculaire (Allen *et al.*, 1998 ; Jaffer et Chernoff, 2002). PAK1 est aussi exprimée dans les cellules sanguines (States *et al.*, 2006). Chez des patients souffrant de retard mental, il a été montré que des mutations dans le gène de PAK3 conduisent à la formation d'une protéine tronquée ne possédant plus d'activité kinase, ou ayant perdu la capacité d'interagir avec les GTPases Rac/Cdc42 (Allen *et al.*, 1998 ; Bienvenu *et al.*, 2000 ; des Portes *et al.*, 1997 ; Donnelly *et al.*, 1996). Les PAKs sont aussi connues pour leur rôle sur l'incidence de l'Alzheimer (Salminen, Suuronen et Kaarniranta, 2008).

La structure des protéines PAK1/3 est très conservée et leur séquence est homologue à 94%. Elles se composent de deux principaux domaines conservés, dont un domaine kinase C-terminal et un domaine N-terminal qui lie p21, mais aussi les GTPases Rac et Cdc42 (Figure 1-11). PAK1-3 possèdent aussi un domaine d'auto-inhibition (AID) juxtaposé au domaine PBD (p21 binding domain). La liaison des GTPases sur le domaine PBD permet la libération du domaine catalytique et lève l'auto-inhibition du domaine AID. Entre le domaine catalytique et le domaine régulateur, se trouve une séquence riche en proline qui permet l'interaction avec Grb2, NCK (non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1) ou PIX (Kreis et Barnier, 2009).

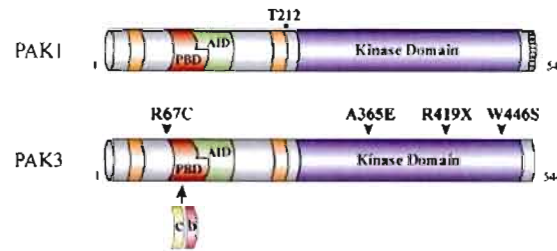


FIGURE 1-11 STRUCTURE DE PAK1 ET PAK3. Les PAKs sont constituées d'un domaine régulateur en leur extrémité N-terminale et d'un domaine kinase en leur extrémité C-terminale. Le domaine AID correspond à un domaine auto-inhibiteur, alors que le domaine PBD lie p21, mais aussi les GTPases Cdc42/Rac. (PBD: P21 binding domain, AID auto-inhibitory domain). Tirée de (Kreis et Barnier, 2009)

PAK3 et PAK1 ont plusieurs interactions et cibles communes. Les PAKs interagissent avec des protéines partageant des annotations GO Processus, comme la croissance et morphogenèse cellulaire (Paxillin, Neurofibromin, Arp2/3, Filamine, Actine alpha, Collagène), mais aussi celles qui partagent des annotations GO Fonction, telle la liaison au cytosquelette d'actine. Ceci est en accord avec le rôle de PAK dans la régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine et les processus de migration cellulaire/morphogenèse. Les PAKs interagissent aussi avec plusieurs familles de protéines ayant un rôle dans la transduction du signal et la communication cellulaire, dont des GTPases et leurs effecteurs (Rac, Cdc42,  $\alpha$ PIX, GIT1/2, Raf1...), divers récepteurs (ER $\alpha$ ; récepteur estrogen  $\alpha$ , AR; récepteur androgène), des protéines d'échafaudage (Merlin, Grb2; growth factor bound protein 2) et des kinases/phosphatases (MEK (MAPK/ERK kinase), LIMK, MLCK, ILK, PKA (cAMP-dependent protein kinase), PP2A (protéine phosphatase 2A), POPX2 (partenaire de PIX 2)) (Arias-Romero et Chernoff, 2008). Les PAKs phosphorylent différentes cibles, dont LIMK, qui phosphoryle la cofiline, ce qui conduit à la stabilisation des filaments d'actines. En parallèle, PAK régule négativement l'activité de MLCK, alors que cette dernière phosphoryle les chaînes légères de myosine (CLM) et régule, par conséquent, l'activité contractile de la myosine. L'inhibition de MLCK conduit donc à une réduction de la contraction de l'appareil actine-myosine. L'intégration de ces deux voies permet la formation des lamellipodes et le froissement des membranes. L'antagonisme entre PAK, effecteur de Rac/Cdc42, et ROCK, kinase effectrice de Rho qui inactive une MLCP

(Myosin Light Chain Phosphatase), suscite beaucoup d'intérêt. Il semble que l'antagonisme entre ces GTPases soit attribuable à leurs effecteurs respectifs.

#### 1.4.2 GIT

GIT-1 (G-protein coupled receptor kinase interacting protein 1), est une protéine multimodulaire, possédant un domaine N-terminal ARF GAP stimulant, l'activité ATPase intrinsèque aux GTPases ARF1 et ARF6 (Figure 1-12). Ce domaine est suivi d'un domaine PBS (Paxillin binding sub-domain), qui permet l'interaction avec la paxillin. Un second domaine d'interaction avec la paxillin se trouve en C-terminal et permet aussi l'interaction avec HIC5 (hydrogen peroxide inducible clone 5), un homologue de la paxillin, et la leupaxine (Gupta *et al.*, 2003 ; Nishiya *et al.*, 2002 ; Turner *et al.*, 1999). La paxillin, HIC5 et la leupaxine sont toutes des protéines adaptatrices associées aux adhésions focales et sollicitées dans la signalisation par les intégrines. GIT-1 possède des répétitions ankyrines ayant un rôle dans l'auto-régulation de son activité (Totaro *et al.*, 2007) et, possiblement, dans sa localisation aux endosomes (Di Cesare *et al.*, 2000). Une série de domaines *coiled-coil* (CC), en torsade d'hélices alpha, permet son homo ou hétérodimérisation (Premont *et al.*, 2004) (Figure 1-11). GIT-1 contient aussi un domaine SHD (Spa2 homology domain) (Figure 1-12), qui permet son interaction avec  $\alpha$  et  $\beta$ PIX, mais aussi avec FAK, MEK, PLC $\gamma$  (phospholipase C gamma), Picollo et possiblement PAK et les GTPases Rac et Cdc42, sous forme de méga complexes oligomériques (Kim *et al.*, 2003 ; Premont *et al.*, 2000 ; Zhao *et al.*, 2000). L'appartenance de ces protéines à la machinerie de régulation de la motilité et de la morphologie cellulaires est indicatrice de leur fonction dans la régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine. Finalement, un domaine FAH (Focal Adhesion targetting homology) et un domaine SLD (synaptic localisation domain) sont présents dans la région C-terminale de GIT-1 et permettent sa localisation aux adhésions focales ou aux protrusions synaptiques respectivement (Figure 1-12).



FIGURE 1-12 : STRUCTURE DE GIT1. GIT1 se compose de domaines GAP, PBS , ANK, SHD , CC et FAH tel que décrit dans le texte. Tiré de (Frank et Hansen, 2008)

Chez l'homme, GIT-1 est exprimée de façon ubiquitaire, mais elle est plus abondante au cerveau et aux dendrites matures et immatures. GIT-1 est, de toute évidence, une protéine multifonctionnelle. Elle contrôle la formation de vésicules du manteau, dans les voies de sécrétions régulées de l'exocytose et de l'endocytose. GIT-1 joue aussi un rôle dans le recyclage des récepteurs par la voie d'endocytose clathrine-dépendante. Elle régule l'adressage des récepteurs AMPAR par une interaction avec la liprine  $\alpha$  (Ko *et al.*, 2003). Par son activité GAP sur ARF6, GIT-1 régule le trafic des récepteurs  $\beta$ 2-adrenergique (Premont *et al.*, 1998). En tant que protéine d'échafaudage, elle joue un rôle crucial dans l'organisation des protéomes post et pré-synaptiques. GIT-1 a aussi été retrouvée au niveau des adhésions focales, dans des complexes protéiques cytoplasmiques et aux protrusions de membranes. C'est par la formation *in vivo* d'un multimère avec ses différents partenaires que GIT-1 assure ses fonctions multiples et critiques dans l'établissement de la plasticité synaptique, dans la formation des épines dendritiques et des synapses, ainsi que dans la motilité cellulaire.

En dehors de ses interactions avec des protéines comme PIX et PAK, qui sont impliquées dans des pathologies telles que le cancer et le retard mental, GIT-1 est aussi un joueur important dans la maladie d'Huntington. GIT-1 interagirait avec l'huntingtine et favorise son aggrégation (Goehler *et al.*, 2004).

#### 1.4.3 PIX

Chez les mammifères, au moins deux isoformes de **PIX** (p21 activated kinase **I**nteracting **eX**change factor) codées par deux gènes différents ont été recensées, soit  $\alpha$  et  $\beta$ PIX, qui s'appellent aussi respectivement ARHGEF6 et ARHGEF7, ou Cool2 et Cool1.  $\alpha$  et  $\beta$ PIX sont

des GEF pour les GTPases de la famille des Rhos et catalysent l'activité d'échange du GDP pour le GTP sur Rac et Cdc42. Plus particulièrement,  $\alpha$ -PIX a une activité GEF vis-à-vis Rac sous forme dimérique et une activité GEF vis-à-vis Cdc42 sous forme monomérique (Baird, Feng et Cerione, 2005 ; Feng, Baird et Cerione, 2004).  $\beta$ -PIX, sous forme de dimère, a affiché une activité catalytique envers Cdc42 seulement, *in vivo* (Feng *et al.*, 2006). Les deux protéines partagent les domaines suivants : SH3 (Src 3 homology domain), qui permet l'interaction avec PAK ; RhoGEF, le domaine catalytique ; PH, qui permet le recrutement aux membranes ; PR (proline riche), une région riche en proline qui permet le recrutement de POPX2/1, une sérine-thréonine phosphatase régulant le cyclage de PAK sous sa forme active/inactive ; GBD (GIT binding domain), qui permet l'interaction avec GIT-1 ; et un domaine CC qui permet la dimérisation de PIX. Les deux isoformes de PIX diffèrent par un domaine unique à  $\alpha$ -PIX de liaison à la calponine (CH), nécessaire à l'interaction avec la  $\beta$ -parvine/affixine, alors que  $\beta$ -PIX possède plutôt un domaine ZB, qui permet son interaction avec Scribble et Shank (Figure 1-13). Scribble et Shank jouent un rôle dans l'exocytose, l'endocytose médiée des récepteurs, la maturation des épines dendritiques et le maintien de la polarité et de la morphogenèse épithéliales (Audebert *et al.*, 2004 ; Bilder et Perrimon, 2000 ; Lahuna *et al.*, 2005 ; Legouis *et al.*, 2000 ; Park *et al.*, 2003 ; Zhang *et al.*, 2005). La  $\beta$ -parvine, est une protéine qui lie l'actine et est associée aux complexes d'adhésion focale. La  $\beta$ -parvine interagit aussi avec ILK (integrin linked kinase) et module l'interaction entre la cellule et la matrice extracellulaire par les intégrines (Rosenberger *et al.*, 2003).



FIGURE 1-13 STRUCTURE D'  $\alpha$  ET  $\beta$ -PIX. En plus de la cassette DH-PH (Dbl homology et plekstrin homology) commune à toutes les GEF de la famille DBL, les protéines PIX contiennent plusieurs domaines d'interactions protéiques : CH (calponine homology), de fonction inconnue ; SH,3 combinant l'interaction avec PAK-1/3 et Rac1 ; PR (proline riche), coalisant l'interaction avec POPX-1/2 ; GBD, médiant l'interaction avec GIT1 ; CC, permettant la dimérisation de PIX ; et ZB, permettant l'interaction avec Scribble et Shank. tiré de (Frank et Hansen, 2008)

Chez l'homme,  $\alpha$ -PIX est exprimé de façon (Kutsche et Gal, 2001). L'expression et/ou la localisation altérée d' $\alpha$ -PIX a été démontrée dans une grande variété de cancers (Filipenko *et al.*, 2005 ; Yokota *et al.*, 2006). Ce fait peut être justifié par le rôle d' $\alpha$ -PIX dans la régulation de la migration cellulaire qui promeut, par conséquent, l'induction du potentiel invasif/métastatique des cellules cancéreuses. De plus, des mutations dans le gène  $\alpha$ -PIX mènent à des formes de retard mental, légères ou sévères, qui s'accompagnent dans certains cas de dimorphismes et de troubles auditifs (Kutsche *et al.*, 2000).  $\alpha$ -PIX se manifeste dans la croissance axonale et dans le contrôle de la morphologie des épines dendritiques (Gallo et Letourneau, 1998 ; Kutsche *et al.*, 2000) par son rôle dans les voies de signalisation qui sont unies par les intégrines et qui mènent à l'activation de Rac et Cdc42 (Rosenberger *et al.*, 2003).  $\beta$ -PIX est exprimée majoritairement au cerveau sous différentes variantes d'épissage et se situe aussi aux membranes synaptiques. Il a été postulé que  $\beta$ -PIX puisse avoir un effet similaire à  $\alpha$ -PIX sur l'incidence des cancers, comme le cancer gastrique, mais il a été désigné pour avoir un effet minimal et non primordial (Li *et al.*, 2002). Par contre, jusqu'à récemment, aucune évidence n'établissait un lien direct entre l'altération de  $\beta$ -PIX et l'émergence de pathologies telles que le retard mental. Ce n'est qu'en 2008 qu'une délétion d'occurrence très rare de la région chromosomique contenant  $\beta$ -PIX a été recensée chez 4 patients présentant un retard mental accompagné d'une microcéphalie (Walczak-Sztulpa *et al.*, 2008). Il faut retenir ici que  $\alpha$  et  $\beta$ -PIX peuvent lier GIT-1 et PAK-1, pour ainsi créer un complexe régulant, de manière spatio-temporelle, le niveau d'activation des GTPases Rac et Cdc42, lors de processus cellulaires tels que la motilité cellulaire, la formation des dendrites, la morphologie des épithéliums et des synapses, ainsi que la régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine. Ils sont des effecteurs de la signalisation par les intégrines.

#### 1.4.4 RÉGULATION DU COMPLEXE PIX/GIT/PAK

Il a été clairement démontré que PIX et GIT sont des protéines multi-modulaires capables de recruter une kyrielle de protéines qui donnent la fonction au complexe. PIX étant une GEF de Rac et Cdc42 et GIT étant une GAP des Arf, la plateforme de signalisation se retrouve à l'intersection des voies de signalisation régulées par les GTPases Rhos et Arfs. Il s'agit d'une



plateforme intéressante à étudier, puisqu'elle est un exemple évident des interactions communicatives des GTPases et de la coordination de différents mécanismes moléculaires pour l'exécution d'un processus cellulaire particulier.

L'étude des domaines protéiques conservés, combinée aux études de purification d'affinité, a permis de mettre en évidence la capacité de PIX à former un homodimère ou un hétérodimère de  $\alpha\beta$ -PIX et à s'associer avec GIT-1 dimérique pour former un oligomère (Premont *et al.*, 2004). L'oligomérisation de PIX est importante pour sa fonction physiologique. L'homo et l'hétérodimérisation de PIX lui confère sa spécificité de localisation cellulaire, sa spécificité catalytique et sa spécificité d'assemblage en un complexe protéique multimérique. Plus récemment, le modèle répandu selon lequel PIX forme un dimère a été confondu par des études de cristallographie à rayon X, qui ont permis de mettre en évidence l'association d'un trimère de PIX et d'un dimère de GIT, pour former un complexe protéique pentamérique (Schlenker et Rittinger, 2009). À la lumière de cette découverte, certaines des conclusions sur l'oligomérisation et la spécificité catalytique devront éventuellement être réinterprétées.

Les interactions entre les membres de ce complexe ont une influence non seulement sur la localisation, mais aussi sur la spécificité et la stimulation des activités catalytiques de chacun des membres. L'association de PIX avec PAK stimule l'activité GEF de PIX envers Cdc42. De plus, l'association de PIX avec Cdc42 stimule l'activité GEF de PIX envers Rac (Feng, Baird et Cerione, 2004). Il est important de savoir que l'interaction de PIX avec GIT est nécessaire au recrutement de PIX au niveau des adhésions focales et des densités post-synaptiques, mais n'est pas essentielle à l'activité GEF de PIX (Feng *et al.*, 2002 ; Zhang *et al.*, 2003). Inversement, il semblerait que l'interaction de PIX avec GIT influence la distribution de GIT (Vitale *et al.*, 2000), mais n'est pas nécessaire à l'activité GAP de GIT.

En ce qui concerne PAK, la stimulation de son activité kinase par Rac/Cdc42 exige son interaction avec le complexe GIT/PIX. Les GTPases Rac1 et Cdc42, sous leur forme active, interagissent avec PAK inactif, provoquant un changement de conformation qui lui permet de se lier à GIT/PIX grâce à une interaction directe avec PIX. C'est l'augmentation de la concentration locale de PAK, par son recrutement au complexe, qui permet son activation par

autophosphorylation, en stimulant l'activité kinase de PAK et sa distanciation subséquente du complexe GIT/PIX (Brown, West et Turner, 2002). Une étude révèle comment GIT1 participe également à l'activation de PAK. GIT1 a la capacité de stimuler l'autophosphorylation d' $\alpha$ PAK, ce qui requiert la participation de la région N-terminale de GIT comprenant le domaine GAP. Par contre, l'activité Arf-GAP n'est pas requise pour cette activation (Loo *et al.*, 2004). Dans certains systèmes, tels que la voie de réponse au stress hyperosmotique, il a été démontré que l'interaction entre PIX et PAK est nécessaire à l'activité kinase de PAK et au roulement des complexes focaux (Chan, Lim et Manser, 2008). L'activation de PAK semble donc pouvoir s'effectuer de manière GTPase-dépendante et GTPase-indépendante.

#### 1.4.5 PIX/GIT/PAK : MORPHOGENÈSE ET MIGRATION

Ce complexe, formé de régulateurs des GTPases Rho et Arf, peut réguler coopérativement la dynamique des membranes et les réarrangements du cytosquelette d'actine. Par conséquent, il peut participer à des comportements cellulaires qui nécessitent l'intégration de ces processus.

Ainsi que décrite précédemment (section 1.2.4), la migration cellulaire nécessite la formation de complexes focaux à la membrane saillante de la cellule, où ils servent de points de traction pour soutenir la protrusion de la membrane. Le complexe focal croît en taille suite à la translocation du corps cellulaire et mature en adhésion focale, qui permettra une fixation stable de la cellule. Simultanément, une nouvelle cohorte de complexes focaux sont reformés à la membrane saillante par le recyclage des intégrines et des autres composantes des adhésions focales (Frank et Hansen, 2008). Ce processus, appelé roulement des complexes focaux, dépend de la dissolution des adhésions focales et est régulé par le complexe GIT/PIX/PAK. Ce dernier permet la structuration des complexes focaux et des adhésions focales. Plus précisément, le complexe GIT-1/ $\beta$ -PIX, est recruté au niveau des adhésions focales, par l'association de GIT-1 avec la paxillin, une protéine d'échafaudage qui s'intègre dans le complexe focal dès l'ancrage des intégrines. Le ciblage et l'intégration du complexe GIT/PIX aux adhésions focales est soumis à une régulation très complexe (Figure 1-14). Premièrement, la paxillin est phosphorylée par PAK pour que son association avec GIT soit



initée (Nayal *et al.*, 2006). Cette interaction permet de cibler GIT à la membrane saillante (Manabe *et al.*, 2002), où l'interaction paxillin/GIT participe au désassemblage des adhésions focales (Zhao *et al.*, 2000). Deuxièmement,  $\beta$ -PIX, qui est liée à GIT, est phosphorylée par FAK et cette phosphorylation augmente l'affinité de  $\beta$ -PIX pour Rac et leur intégration dans les complexes focaux (Chang *et al.*, 2007). L'absence de cette phosphorylation par FAK perturbe donc le recrutement du complexe GIT/PIX/PAK/Rac aux adhésions focales. Le recrutement de GIT/PIX aux adhésions focales favorise la libération de la paxillin, ce qui déstabilise les adhésions focales et avantage la motilité cellulaire. Le désassemblage des adhésions focales en structure transitoire, les complexes focaux, se fait aussi par l'action inhibitrice de PAK sur MLCK, ce qui résulte en une réduction de la contractilité et la dissolution des adhésions focales, mais aussi en l'activation de Rac et Cdc42 par l'activité GEF de PIX. Ceci entraîne la transition des complexes Rhos-dépendants stables vers la formation des complexes Rac/Cdc42-dépendants, plus instables. Rho et Rac/Cdc42 ont encore une fois une action antagoniste sur le roulement des complexes focaux. Finalement, GIT/PIX permet de restreindre la formation des lamellipodes initiée par Rac, aux sites présentant des complexes focaux. Ainsi, GIT/PIX évite que la formation de lamellipodes et la migration deviennent aléatoires.

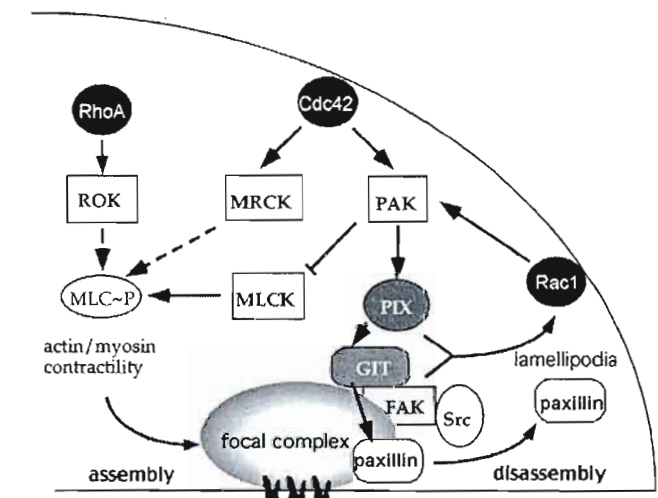


FIGURE 1-14: ROULEMENT DES COMPLEXES FOCaux. Les complexes focaux, tels que décrits dans le texte ci-haut. Tiré de (Zhao *et al.*, 2000).

Le complexe GIT/PIX joue un rôle primordial dans la polarité et la morphogénèse cellulaires. Un des mécanismes par lequel le complexe GIT/PIX promeut la polarité et la morphogénèse a été élucidé par des expériences de fermeture de brèche. L'intérêt de ce modèle, c'est qu'il prend en considération non seulement les stimuli d'initiation de la migration et de la polarisation, mais aussi les interactions intercellulaires. Dans ce système expérimental,  $\beta$ -PIX est recrutée à la membrane saillante de la cellule par l'interaction de son domaine PDZ avec la protéine Scribble (Figure 1-15). Scribble contrôle la direction de migration cellulaire et est un déterminant des adhésions intercellulaires accolées par les cadhérines dans les cellules épithéliales des mammifères (Dow *et al.*, 2007 ; Qin *et al.*, 2005). L'interaction de PIX avec Scribble est nécessaire pour le recrutement de PIX aux protrusions membranaires. Le recrutement de PIX aux protrusions membranaires élicite l'activation de Cdc42, qui initie la migration cellulaire.

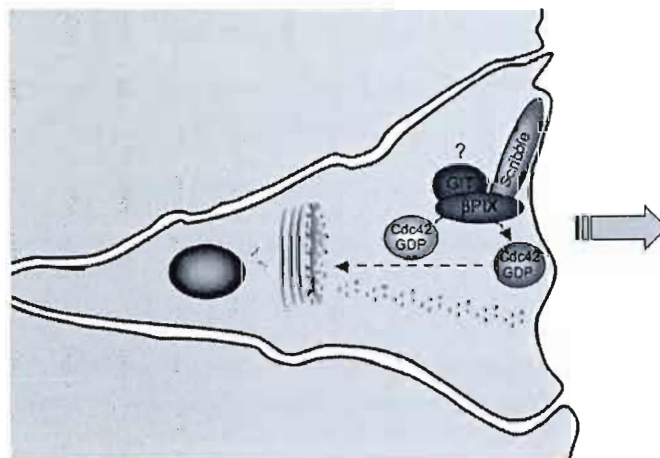


FIGURE 1-15 :  $\beta$ -PIX ET SCRIBBLE DANS LA POLARITÉ ET LA MIGRATION CELLULAIRES. Scribble permet le recrutement de  $\beta$ -PIX à la membrane saillante pour une activation localisée de Cdc42. Le rôle de GIT1 reste à élucider dans ce système. tiré de (Frank et Hansen, 2008)

#### 1.4.6 PIX /GIT/ PAK ET LA PLASTICITÉ SYNAPTIQUE

PIX/GIT/PAK sont des composantes des adhésions focales post-synaptiques. Les adhésions focales ne sont pas seulement le lien entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette d'actine, mais également des sites pour l'intégration d'une gamme diversifiée de signaux en

provenance des récepteurs de la surface cellulaire (Turner, 2000). Le complexe GIT/PIX, à la synapse, régule les structures et la localisation des complexes protéiques.

De façon similaire à la cellule en migration, la morphogenèse des épines dendritiques/synapses débute par la formation de lamellipodes, ce qui permet l'initiation de l'élongation de l'axone et des dendrites. Les synapses résultent de la maturation des filopodes/lamellipodes dendritiques et de leur transition en synapses ovoïdes. Le complexe GIT/PIX/PAK est recruté aux synapses en formation et remplit la fonction de complexes d'échafaudage. Il colocalise avec des protéines qu'il recrute, telles que piccolo, liprine  $\alpha$ , PIX, PAK, nexine, Grb4 (growth factor receptor binding protein 4), shank, Rac et Cdc42. Il permet l'interaction avec la membrane axonale pré-synaptique par la signalisation de l'éphrine, ce qui permet de restreindre la formation des nouvelles synapses au site de connexion avec le ligand éphrine (Figure 1-16). Le complexe, qui se constitue à la membrane post-synaptique des synapses en formation, est composé de protéines dont la fonction converge vers la régulation de la structure synaptique. Cette fonction du complexe dans l'organisation de la structure synaptique et la formation des synapses passerait par l'activation des CLM (Figure 1-16). En effet, une étude sur des neurones de l'hippocampe de rats a montré que l'activation des CLM régulatrices (CLMr) de la myosine II résulte en l'augmentation du nombre de protrusions dendritiques et du nombre de synapses, alors que l'inhibition de l'activité ATPase de la myosine II produit l'effet contraire (Zhang *et al.*, 2005). L'activation des CLMr se ferait en aval de la voie GIT/PIX/Rac/PAK.

De plus, GIT-1 et PIX-1 pourraient agir sur l'adressage du récepteur au glutamate AMPAR (Figure 1-16). En effet, l'interaction de GIT-1 avec la liprine  $\alpha$  permettrait l'adressage d'AMPAR aux membranes post-synaptiques (Ko *et al.*, 2003), alors que PIX1 a été désignée, du moins chez la drosophile, pour réduire l'accumulation d'une sous-unité de récepteurs au glutamate AMPAR aux membranes post-synaptiques des jonctions neuro-musculaires (Parnas *et al.*, 2001).

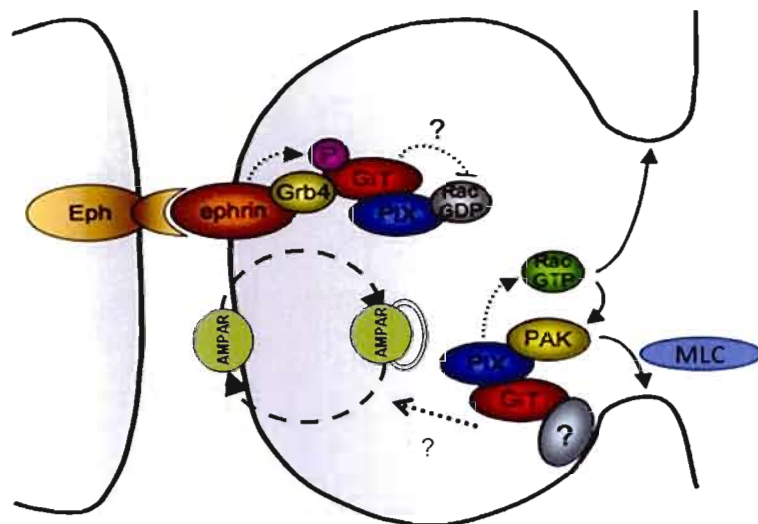


FIGURE 1-16 : FONCTION DU COMPLEXE GIT/PIX/PAK À LA SYNAPSE. PIX et GIT sont recrutées à la membrane via Grb4 et l'éphrine, ce qui permet de restreindre l'activation locale de PAK et Rac pour la morphologie des épines dendritiques. La formation et la morphologie des synapses dépendraient de l'activation des CLMr par PAK. GIT semble engagée dans le ciblage des récepteurs AMPAR aux membranes post-synaptiques. Adapté de (Frank et Hansen, 2008)

#### 1.4.7 PIX/GIT/PAK CHEZ *C. ELEGANS*

Chez *C. elegans*, les orthologues d'  $\alpha\beta$ -PIX, PAK-1/3 et GIT-1 sont respectivement appelés *pix-1*, *pak-1* et *git-1*. Ces derniers partagent une homologie de séquence en acides aminés respective de 24, 52 et 34% avec leurs homologues humains. Par contre, de façon plus importante, les domaines protéiques permettant l'interaction entre PIX-1, GIT-1 et PAK-1, ainsi que plusieurs de leurs partenaires moléculaires, sont conservés entre le nématode et l'homme (Figure 1-16), suggérant fortement que ces protéines forment aussi chez le nématode une plateforme de signalisation intégrant les voies des Arfs et GTPases Rhos.

En particulier, les domaines fonctionnels sont conservés sur PAK-1, soit celui d'interaction avec PIX (PR) et avec les GTPases (PBD) (Smart e-value = 1.40e-12), incluant le domaine kinase (Smart e-value = 8.13e-97). Chez le nématode, deux autres homologues de PAK sont recensés, soit MAX-2 et PAK-2 (Figure 1-17). L'homologie de séquence est plus

significative entre PAK-1 du nématode et PAK-3 des mammifères, mais la différence est minime. *max-2* et *pak-2* sont possiblement des duplications géniques qui ont une fonction redondante avec *pak-1* et, par conséquent, pourraient démontrer la pression de sélection au cours de l'évolution pour le maintien du chevauchement fonctionnel de ces gènes. Ceci corrèle bien avec l'importance de la fonction de *pak-1* qu'on observe déjà dans les organismes supérieurs. Il sera alors intéressant d'évaluer l'altération phénotypique des nématodes portant une mutation pour ces gènes, afin d'évaluer la fonction de ces protéines et leur redondance dans les phénomènes cellulaires et moléculaires étudiés.



FIGURE 1-17 : HOMOLOGUE DE PAK-1/3 HUMAIN CHEZ LE NÉMATODE. La figure illustre la conservation des domaines fonctionnels des homologues de PAK-1/3, soit PAK-1, MAX-2, PAK-2 chez le nématode. (Hs : *Homo sapiens*, Ce : *C. elegans*, PR; proline riche).

PIX-1 partage une plus grande homologie de séquences avec  $\alpha$ -PIX, ce qui porte à croire que PIX-1 est l'homologue fonctionnel d' $\alpha$ -PIX chez le nématode. Par contre, en termes de conservation des domaines fonctionnels, PIX-1 ressemble davantage à  $\beta$ -PIX, vu l'absence du domaine CH qui serait unique à  $\alpha$ -PIX. La région riche en proline (PR), qui permet l'interaction avec la phosphatase POPX-2, dont l'homologue est FEM-2 chez le nématode, est aussi conservée et correspond à une séquence PPXXPP. Le domaine SH3 (Smart e-value= 2.44e-20) permettant l'interaction avec PAK, le domaine DH donnant la fonction catalytique de GEF (Smart e-value= 8.24e-33) et le domaine PH (Smart e-value= 6.96e+02), permettant l'ancrage aux membranes sont aussi conservés, de même que le domaine GBD (Smart e-value= 1.70e+03) permettant l'interaction avec GIT-1 (Figure 1-18).

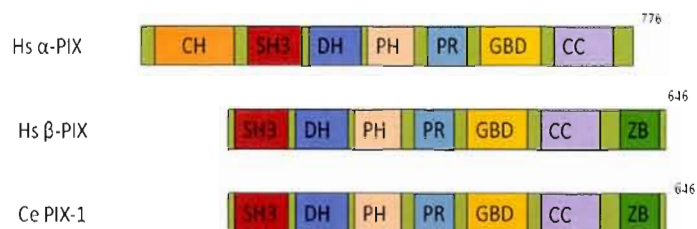


FIGURE 1-18 : HOMOLOGUE DE PIX HUMAIN CHEZ LE NÉMATODE. La figure illustre la conservation des domaines fonctionnels de l'homologue d' $\alpha\beta$ -PIX, dont PIX-1 chez le nématode, comparativement à l'homme. (Hs : *Homo sapiens*, Ce : *C. elegans*)

À cela s'ajoute la présence potentielle d'un domaine PDZ en position C-terminale de PIX-1 (identifié ZB sur la Figure 1-18). En effet, suite à un alignement CLUSTAL W (Waterhouse *et al.*, 2009), en utilisant 36 séquences de domaines PDZ présents sur des protéines de *C. elegans*, on remarque que la région C-terminale de PIX-1 semble partager la séquence consensus du domaine sans seuil ou avec un seuil restrictif de 50 (Figure 1-19). La présence du domaine d'interaction avec Scribble et Shank et l'absence du domaine d'interaction avec la calponine sont une forte indication que PIX-1 est l'homologue fonctionnel de  $\beta$ -PIX.



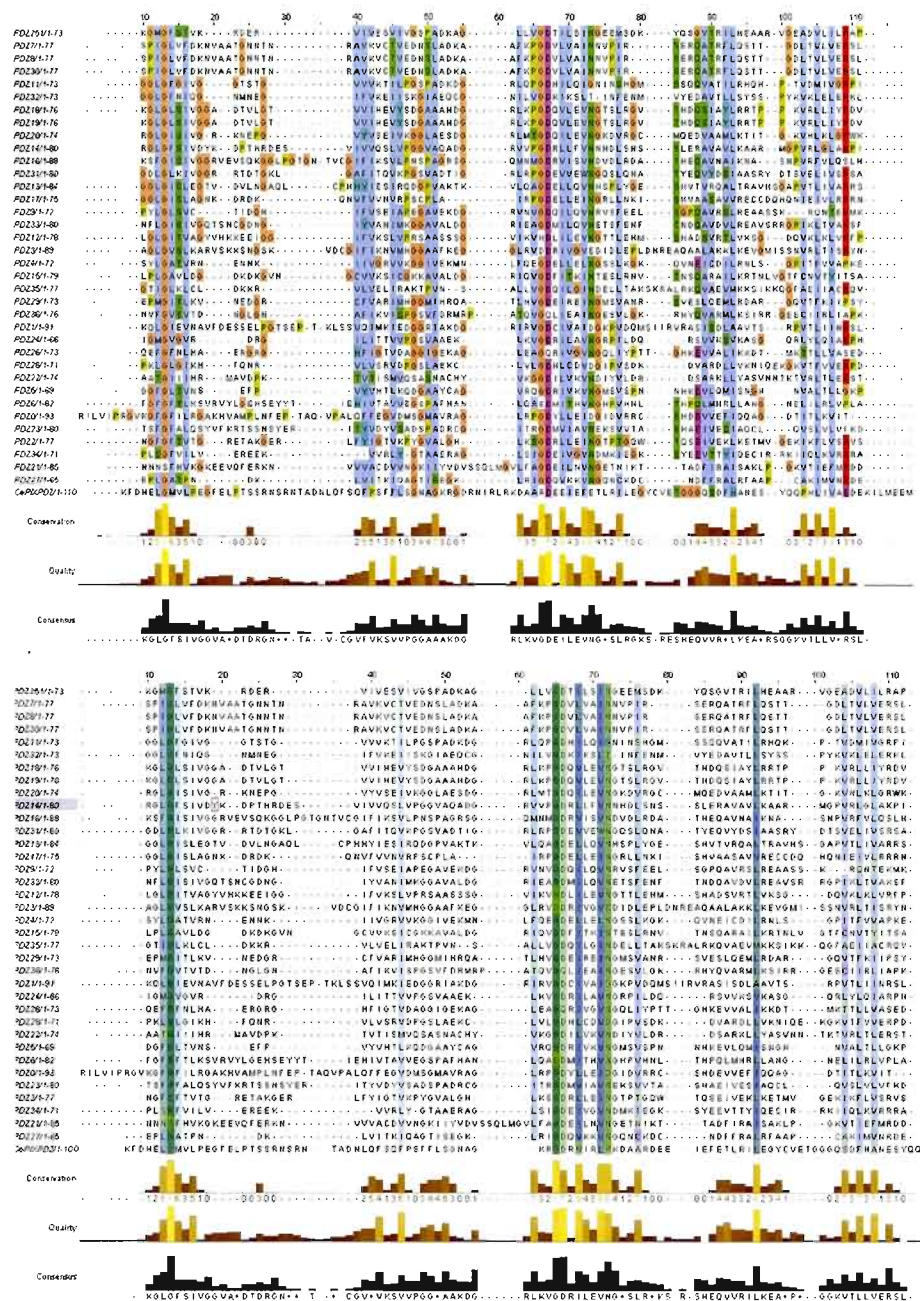


FIGURE 1-19 : SÉQUENCE CONSENSUS DU DOMAINE PDZ DE PIX-1. Panneau supérieur : Alignement ClustalW de la séquence consensus du domaine PDZ avec PIX-1 sans seuil restrictif, Panneau inférieur : Alignement ClustalW de la séquence consensus du domaine PDZ avec PIX-1 et un seuil restrictif de 50.

GIT-1 chez *C. elegans* conserve aussi son domaine d'interaction avec PIX (SHD) (Smart e-value= 4.19e-08) ainsi que son domaine catalytique GAP pour les GTPases Arf (Smart e-

value= 6.95e-51) (Figure 1-20). Les domaines Ankyrine sont aussi conservés (Smart e-value= 1.27e+03 et 7.83e-03).

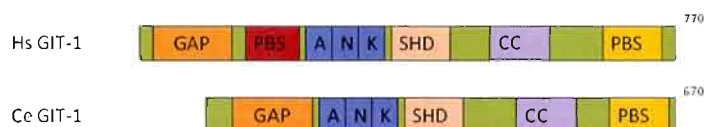


FIGURE 1-20 : HOMOLOGUE DE GIT-1 HUMAIN CHEZ LE NÉMATODE. Chez le nématode, GIT-1, l'homologue de GIT-1 (Hs : Homo sapiens, Ce : *C. elegans*)

Le domaine d'interaction avec la paxillin (PBS), en position C-Terminal est absent alors que le domaine PBS en C-terminal (Figure 1-20), ne ressort pas des analyses de domaines conservés (smart.org). La séquence en acide aminés requise pour l'interaction entre GIT-1 et la paxillin chez les mammifères est (STEDVILKTEQVTKNIQELLRAAQEFKHDS) (Zhang *et al.*, 2008). Un alignement CLUSTAL W (Waterhouse *et al.*, 2009) arrive à faire ressortir une séquence consensus et l'homologie est suffisante pour générer un alignement 2BlastP (Figure 1-21).

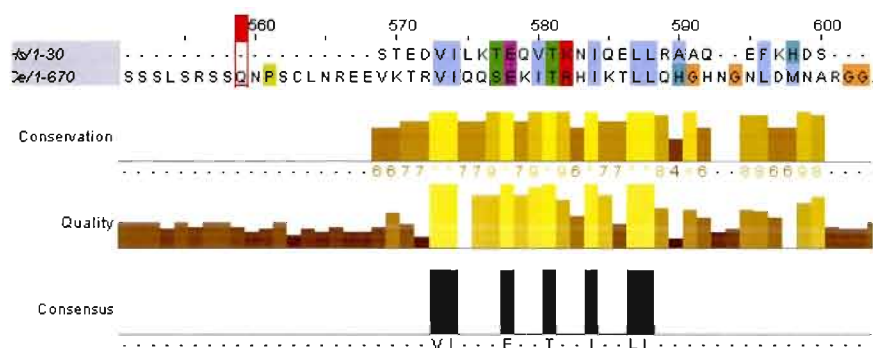


FIGURE 1-21 : IDENTIFICATION DU DOMAINE D'INTERACTION AVEC LA PAXILLIN EN POSITION C-TERMINALE DE GIT-1. La séquence supérieure correspond à la séquence en acide aminés du domaine PBS présent sur GIT-1 mammifère. L'alignement avec la séquence complète de GIT-1 du nématode permet de retrouver, dans la région C-terminale, la séquence du domaine PBS et d'obtenir aussi une séquence consensus pour ce domaine.



La conservation structurale des protéines indique qu'il y a probablement conservation fonctionnelle. Alors que le complexe GIT/PIX/PAK est largement étudié dans une variété d'espèces et de systèmes, de la drosophile à l'homme en passant par la souris, chez *C. elegans*, ce complexe protéique est à ce jour peu étudié. La première étude sur la fonction de ce complexe chez le nématode fut publiée à la fin de l'année 2008. Cette première étude a mis en évidence deux voies de signalisation impliquant ce complexe.

En effet, le complexe GIT/PIX/PAK serait soumis à la signalisation par les intégrines et participerait, de manière indépendante des GTPases, à l'élongation des gonades. Cette voie de signalisation fonctionne en parallèle à une seconde voie, qui est GTPases-dépendante. Dans cette voie, les GTPases Rac et Cdc42 permettent l'activation de PAK-1 et, de manière redondante, de MAX-2 (Figure 1-22) (Lucanic et Cheng, 2008). Il s'agit là de la seule étude montrant la fonction de ces protéines en complexes chez le nématode. La gonade, chez *C. elegans*, est un repère biologique qui s'est avéré fort utile pour l'étude de la biologie du développement et des processus cellulaires du développement conservés à travers les métazoaires, dont la différenciation, la morphogenèse (migration, adhérence, remodelage) et l'apoptose (Hubbard et Greenstein, 2000). Par conséquent, la signalisation de la morphogenèse de la gonade pourrait aussi être traduite à d'autres étapes du développement du nématode, en considérant que les machineries de signalisation sont conservées.

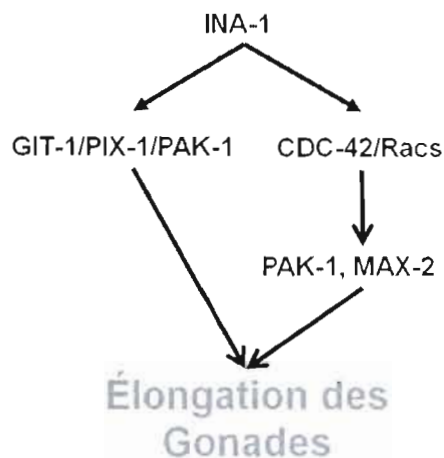


FIGURE 1-22 : GIT/PIX/PAK RÉGULE L'ÉLONGATION DES GONADES. L'élongation des gonades est contrôlée par deux voies en aval des intégrines: une voie GTPases dépendantes envers le complexe GIT/PIX/PAK et une voie GTPases dépendantes par les kinases PAK-1 et MAX-2.

GIT-1, chez le nématode a aussi été rapporté pour colocaliser, à la membrane pré-synaptique de certains neurones, avec des protéines telles que SYD-2 (liprin  $\alpha$ ). GIT-1 participerait à l'organisation hiérarchique de l'assemblage des complexes protéiques pré-synaptiques durant la synaptogenèse (Patel *et al.*, 2006).

Quant à *pix-1*, il est très peu caractérisé chez le nématode. Il a été identifié pour sa fonction dans le processus d'élongation des gonades (Lucanic et Cheng, 2008) et pour son implication dans le processus d'élongation de l'embryon (Harel, Lee et Jenna, 2009).

PAK-1 est beaucoup plus étudié. Tout d'abord, son expression spécifique aux limites des cellules hypodermiques, au cours de l'élongation de l'embryon, a été signalée (Chen *et al.*, 1996). PAK-1 colocalise aussi avec Rac1 et Cdc42 durant cette étape du développement (Chen *et al.*, 1996). PAK-1 est exprimé aussi au niveau des cellules des muscles, du pharynx et des nerfs moteurs le long de la corde ventrale (Iino et Yamamoto, 1998). PAK-1 participerait à la dynamique de structuration des protéines des jonctions apicales des épithéliums (Muller et Bossinger, 2003). PAK-1 a été désigné pour fonctionner en parallèle à

MAX-2 pour l'orientation des excroissances axonales, en aval de la signalisation par CED-10, MIG-2 (Lucanic *et al.*, 2006) et RAC-2 (Quinn, Pfeil et Wadsworth, 2008).

Pressenti par plusieurs chercheurs depuis 1996, le rôle de PAK-1 dans l'élongation a été mis en évidence à l'automne 2009. PAK-1 a ainsi été montré pour être une kinase phosphorylant directement l'homologue des chaînes légères de myosine, MLC-4, régulatrice de la myosine II, ainsi qu'une seconde protéine participant à la coordination de l'élongation de l'embryon (Gally *et al.*, 2009). MLC-4, sa fonction et les voies régulant son activité sont depuis longtemps étudiées. L'activité de MLC-4 serait régulée, en partie, par une voie engageant LET-502 (Homologue de ROCK) et MEL-11 (homologue de MLCP) (Piekny, Wissmann et Mains, 2000) (Figure 1-23).

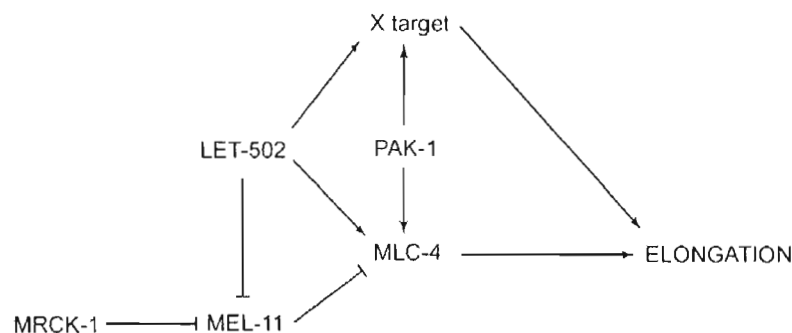


FIGURE 1-23 : PAK-1 RÉGULE L'ACTIVITÉ DES CLM DURANT L'ÉLONGATION DES EMBRYONS CHEZ *C. ELEGANS*. PAK-1 est parallèle à LET-502/MEL-11 pour phosphoryler MLC-4 dans le processus d'élongation. Tiré de (Gally *et al.*, 2009)

Tout comme chez les mammifères, les recherches réalisées à ce jour chez le nématode *C. elegans* laissent présager que GIT, PIX et PAK puissent fonctionner en complexe, de manière GTPases-dépendante ou indépendante. De plus, à l'instar de leur rôle chez les mammifères, il semblerait que ces protéines puissent jouer un rôle durant le développement embryonnaire (PAK-1) et dans certains processus neurologiques (PAK-1 et GIT-1). La fonction de PIX-1 reste pratiquement inconnue à ce jour.

## 1.5 LE DÉVELOPPEMENT CHEZ *C. ELEGANS*

### 1.5.1 DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE ET MORPHOGENÈSE

Le développement chez *C. elegans* se déroule en trois grande phases : une première, suite à la fécondation où sont observés principalement la multiplication cellulaire et l'établissement des axes dans l'embryon ; une seconde, qui inclut la différenciation cellulaire et la morphogenèse sans prolifération cellulaire ; puis la troisième phase, qui ne sera pas abordée ici, comprenant le développement post-embryonnaire.

La morphogenèse de l'embryon chez *C. elegans* nécessite, comme chez tous les métazoaires, la coordination de la migration cellulaire, l'adhérence cellulaire et la modification de la morphologie cellulaire. La morphogenèse de l'embryon est concomitante à la prolifération cellulaire et s'amorce avec la gastrulation. La gastrulation est le premier événement morphogénétique, qui débute au stade de 26 cellules et dépend principalement de la migration cellulaire. Chez le nématode, l'étape de gastrulation nécessite l'acquisition de la polarité baso-apicale des cellules de l'embryon (Rohrschneider et Nance, 2009). Il s'ensuit des processus d'intercalation dorsale, de fermeture ventrale et, finalement, d'élongation qui permettront de déterminer la forme de l'embryon et de la larve, suite à la prolifération cellulaire (Chisholm et Hardin, 2005).

### 1.5.2 L'INTERCALATION DORSALE DES CELLULES HYPODERMIQUES

L'intercalation dorsale des cellules épidermiques consiste en la fusion de deux rangées de cellules épidermiques, qui s'intercalent pour ne former qu'une seule rangée (Figure 1-24). Ce processus nécessite la coordination de deux comportements cellulaires, soit la migration cellulaire et la modification de la morphologie cellulaire (de ronde à cunéiforme). L'intercalation dorsale des cellules épidermiques se fait par l'allongement de protubérances de la membrane baso-latérale. La polymérisation du cytosquelette d'actine est essentielle à ce processus morphogénétique (Priess et Hirsh, 1986). D'ailleurs, Arp2/3, protéine permettant

l'initiation de la polymérisation de l'actine lors de la migration cellulaire, semble nécessaire à l'intercalation (Severson, Baillie et Bowerman, 2002). Le processus d'intercalation passe donc fort probablement par une signalisation via les GTPases Rhos, plus particulièrement les GTPases de type Rac (CED-10, RAC-2 ou MIG-2) ou CDC-42. Du reste, deux gènes, parmi les rares gènes identifiés pour leur fonction dans le processus d'intercalation, soit *gex-2* et *gex-3*, codent pour des protéines interagissant avec les GTPases Rac (Severson, Baillie et Bowerman, 2002).

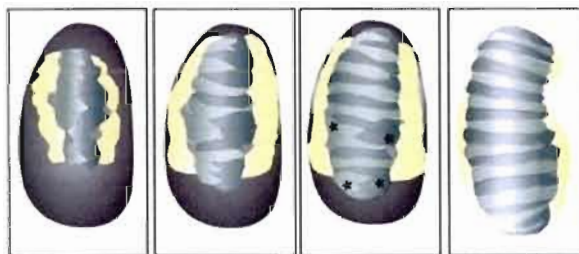


FIGURE 1-24 : L'INTERCALATION DES CELLULES DORSALES. Les cellules dorsales sont en bleu sarcelle, les cellules de l'épiderme sont en jaune. Les cellules dorsales nées sur le côté droit de l'embryon sont plus claires que celles nées sur la gauche. Les deux dernières paires de cellules épidermiques dorsales à s'intercaler (voir \*) sont les « cellules pointeuses » et servent de marqueurs du progrès de l'intercalation dans les embryons wt. . Tiré de (Chisholm et Hardin, 2005)

### 1.5.3 LA FERMETURE VENTRALE

La fermeture ventrale de l'hypoderme implique la propagation bilatérale des cellules formant l'épiderme (Figure 1-25). Ce processus morphogénique dépend de la capacité de migration des cellules épidermiques et donc de la formation de filopodes. Il s'effectue, en partie, simultanément à l'intercalation dorsale. Suite à la migration des cellules épidermiques, la fermeture se complète par la formation de jonctions adhérentes avec les cellules

controlatérales voisines qui ont migré bilatéralement et simultanément. Ce processus morphogénique permet d'entourer l'embryon d'un épithélium continu et l'intégrité de cet épithélium est nécessaire à l'étape subséquente d'élongation (Chisholm et Hardin, 2005).



FIGURE 1-25: LA FERMETURE VENTRALE Les cellules ventrales sont en rose, les cellules épidermiques latérales sont en jaune et les dorsales, autour de la queue, sont en bleu sarcelle. Les autres cellules internes sont représentées en gris. Les deux premières paires de cellules ventrales qui atteignent la ligne médiane ventrale sont appelées « cellules directrices ». Après que les cellules directrices aient formé un contact au niveau de la ligne médiane, les cellules de la pochette ventrale sont les deuxièmes à étendre des protubérances et à atteindre la ligne médiane. Tiré de (Chisholm et Hardin, 2005)

Plusieurs protéines ont été identifiées pour participer au processus de fermeture ventrale.

Entre autres, on retrouve les récepteurs de l'éphrine (*efn-1/4*), les molécules d'adhésion cadhérine et caténine, les protéines interagissant avec le cytosquelette d'actine et la GTPase homologue de Rac (*ced-10*), ainsi que leurs interactants (Chisholm et Hardin, 2005).

#### 1.5.4 L'ÉLONGATION

L'étape d'élongation au cours de l'embryogénèse permet l'allongement d'un embryon sphérique, qui tend ainsi à devenir une larve vermiforme. Cet événement morphogénique nécessite des modifications importantes de la morphologie cellulaire. Les cellules épidermiques s'allongent sur leur axe longitudinal, de manière concomitante à une réduction de leur diamètre transversal (Figure 1-26). Ce processus morphogénique est le mieux caractérisé chez le nématode.

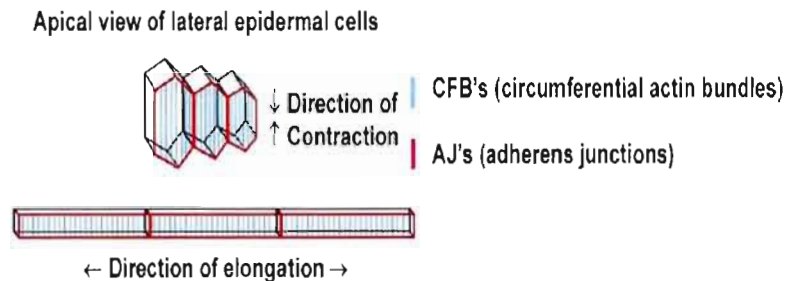


FIGURE 1-26 : L'ÉLONGATION DES CELLULES DE L'ÉPIDERME. Le schéma montre une coupe latérale des modifications morphologiques des cellules épidermiques latérales, au cours de l'élongation. Les cellules épidermiques latérales représentent le début de l'élongation et les flèches indiquent la direction de la contraction des FAC (CFB en bleu). Les cellules latérales changent de forme, devenant ainsi plus longues sur leur axe longitudinal avec un raccourcissement transversal concomitant, ce qui entraîne un changement de forme dans le sens des flèches. Les cellules épidermiques latérales sont liées par les AJ (jonctions adhérentes, en rouge). Tiré de (Piekny et Mains, 2003).

L'allongement de l'embryon se fait par une régulation stricte de la contraction des filaments d'actine circonférentielle (FAC), située au pôle apical des cellules épidermiques (Figure 1-27A). L'épiderme du nématode se divise en trois couches : ventrale, latérale et dorsale, liées entre elles par des jonctions adhérentes (Figure 1-27A). L'élongation précoce, qui permet de passer du stade coma au stade plié 1,5 fois (Figure 1-27B), requiert la contraction des FACs dans les cellules latérales épidermiques par phosphorylation des CLMr, MLC-4 (Figure 1-27A). Ce processus d'élongation précoce est suivi d'une étape ultérieure impliquant les muscles qui sont attachés aux cellules épidermiques dorsales et ventrales, par des structures appelées attachements trans-épidermiques (ATE) (Figure 1-27A). Les ATE sont des structures composées de filaments intermédiaires d'actine faisant le lien entre la paroi musculaire, située au pôle baso-latéral, et la cuticule, située au pôle apical de l'épiderme, (Figure 1-27A). Au stade plié 1,75 fois, les sarcomères musculaires sont entièrement fonctionnels et se contractent. La force de contraction musculaire est transmise à l'épiderme embryonnaire par les ATE et permet la complétion de l'élongation jusqu'au stade plié 4 fois (Figure 1-27A-B) (Cox et Hardin, 2004 ; Labouesse, 2006).



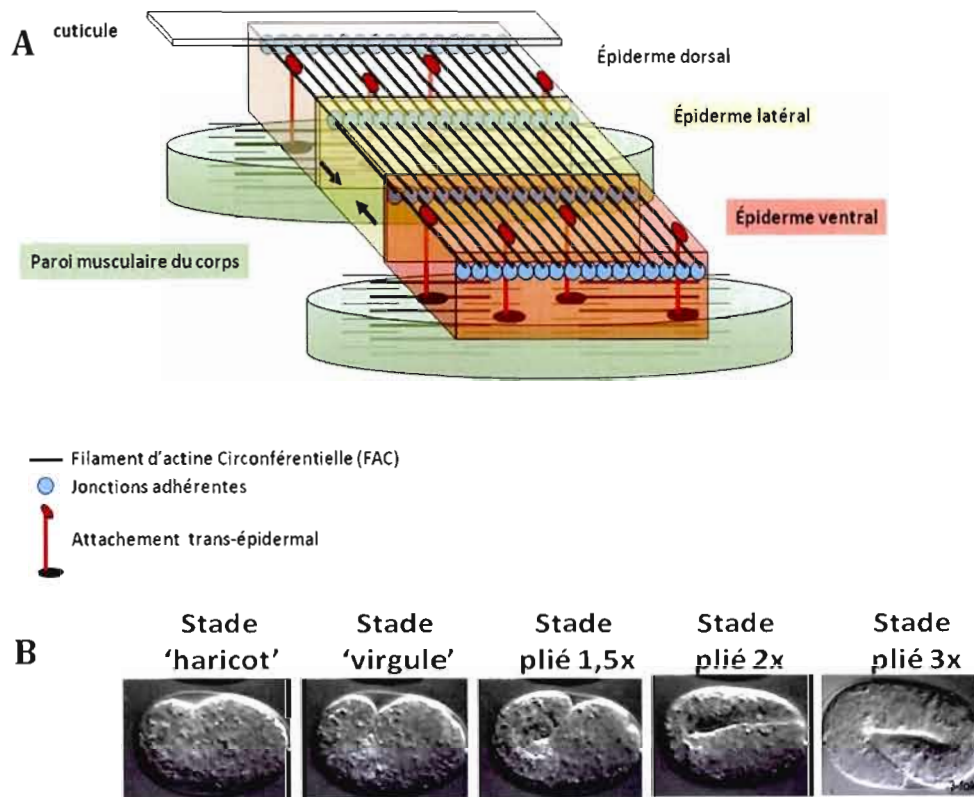


FIGURE 1-27 : STRUCTURE DE L'ÉPIDERME EMBRYONNAIRE ET STADE D'ÉLONGATION. A) L'épiderme se compose de cellules épidermiques ventrales, dorsales et latérales (en orange, rose et jaune), qui sont liées par des jonctions adhérentes. Les FACs se retrouvent à la face apicale et permettent la contraction des cellules épidermiques latérales, pour l'élongation du stade coma au stade plié 1,5 fois. Les cellules dorsales et ventrales sont attachées à la paroi musculaire du corps par les ATE et permettent l'élongation du stade plié 1,75 fois au stade plié 4 fois (tiré de (Harel, Lee et Jenna, 2009) . B) L'embryon ovoïde s'allonge de quatre fois sa longueur initiale, en passant par 5 stades discernables qui sont les stades haricot, coma (virgule) et plié 1,5, 2 et 3 fois.

Une panoplie de gènes ont été identifiés pour contrôler le processus d'élongation. Ces gènes représentent trois structures/machineries cellulaires. On retrouve les gènes codant pour des protéines permettant la formation des jonctions apicales, dont *ajm-1*, *dlg-1*, *hmr-1*, *hmp-1/2* (caténines et cadhérines), au pôle apical des cellules épidermiques (Piekný et Mains, 2003). On retrouve aussi les gènes codant pour l'appareil contractile d'actine-myosine et leurs régulateurs, soit : *mhc-4* (chaînes légères régulatrices de la myosine II), *nmy-1/2* (chaînes lourdes de myosine), *mel-11* (phosphatase des CLMr) (Piekný *et al.*, 2003). Finalement, on



retrouve plusieurs GTPases Rhos, leurs régulateurs et leurs effecteurs (Piekny et Mains, 2003).

#### 1.5.5 RÉGULATION DE LA FORMATION DES JONCTIONS APICALES

Chez *C. elegans*, les jonctions apicales sont très similaires, en composition, aux jonctions adhérentes des mammifères. Elles sont composées de cadhérines et caténines, de vinculine et d' $\alpha$ -actinine et sont essentielles au maintien de l'intégrité de l'épiderme. De plus, les FACs, qui se contractent lors de l'élongation, sont ancrés aux jonctions apicales. L'ancrage des FACs aux jonctions apicales est en partie attribuable à VAB-9, une claudine localisée aux jonctions par son interaction avec les caténines et les cadhérines. Ainsi, l'intégrité des jonctions apicales est indispensable à la formation de l'épiderme et à une élongation normale. Deux autres protéines participent au maintien des jonctions apicales, soit DLG-1 et AJM-1, des protéines d'échafaudage, situées à la base des jonctions apicales (Cox et Hardin, 2004). Les mutants pertes de fonctions de *ajm-1* et *dlg-1* présentent un phénotype d'arrêt d'élongation entre le stade plié 2 fois et le stade plié 3 fois. Finalement, la polarité des jonctions apicales est établie et maintenue par l'action de LET-413, l'homologue de Scribble. Il est intéressant de se souvenir ici que Scribble est un partenaire fonctionnel de PIX chez les mammifères (section 1.4.5) (Cox et Hardin, 2004 ; Labouesse, 2006).

#### 1.5.6 RÉGULATION DE L'APPAREIL CONTRACTILE D'ACTINE-MYOSINE DURANT L'ÉLONGATION

La contraction des FACs dans les cellules latérales au cours de l'élongation précoce repose sur une limitation stricte de l'activité des chaînes régulatrices de myosine MLC-4. L'activité de MLC-4 est contrôlée par trois kinases, LET-502/ROK, MRCK-1 et PAK-1 (Gally *et al.*, 2009), et une phosphatase, MEL-11 (Piekny, Wissmann et Mains, 2000). LET-502 et MRCK-1 ont été désignées pour promouvoir la phosphorylation de MLC-4 et, par conséquent, la contraction des FACs en inhibant la fonction de MEL-11 dans les cellules latérales de l'épiderme où LET-502 et RHO-1 sont exprimées (Figure 1-28). Afin d'éviter une rupture des embryons au cours de l'élongation, la contraction de l'appareil actine-myosine est inhibée

dans les cellules dorsales et ventrales de l'épiderme. L'inhibition de la contraction dans les cellules de l'hypoderme dorsales et ventrales est due à la faible expression de LET-502, combiné à l'expression de RGA-2 dans ces cellules. RGA-2 est une Rho-GAP qui inactive RHO-1 et qui permet la levée de l'inhibition de LET-502 sur de MEL-11 (Figure 1-28).

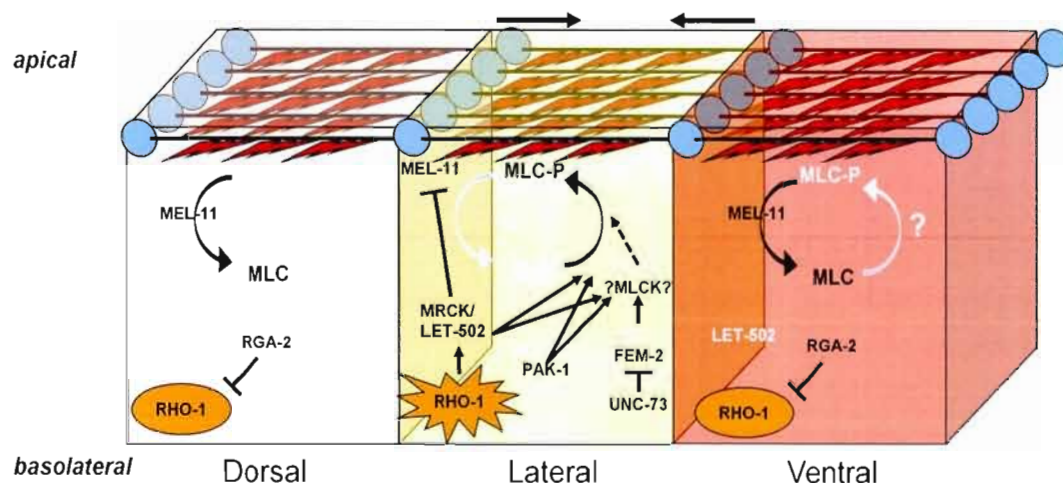


FIGURE 1-28 : RÉGULATION SPATIALE DE LA CONTRACTION DE L'APPAREIL ACTINE-MYOSINE. Lors de l'élongation, les cellules latérales se contractent. Pour initier la contraction on retrouve une machinerie de signalisation favorisant l'activation des CLMr. Rho-1 y est active, elle active LET-502 et MRCK qui inactiveront MEL-11. De plus LET-502 phosphorylera MLC-4. En parallèle PAK-1 phosphoryle aussi MLC-4. Ces processus favoriseront la contraction des cellules latérales. Simultanément, au niveau des cellules dorsales et ventrales, une GAP inactivant Rho-1 (RGA-2) est exprimée favorisant un état de relaxation qui évitera la rupture de l'embryon durant l'élongation (Harel, Lee et Jenna, 2009).

Il n'est pas exclu que LET-502 puisse directement phosphoryler MLC-4, tout comme le ferait aussi PAK-1. De plus, LET-502 et PAK-1, phosphoryleraient/activeraient une cible supplémentaire, possiblement une protéine conduisant aussi à la phosphorylation des CLM ou régulant autrement l'activité de l'appareil contractile d'actine-myosine (ACAM)(Gally *et al.*, 2009). Selon Gally *et al.*, leurs résultats sont cohérents avec la fonction de MRCK et ROCK proposée par une étude identifiant les kinases régulatrices des CLMr, avec des extraits de cellules de carcinomes (Wilkinson, Paterson et Marshall, 2005). Les auteurs de cette étude mettent aussi en évidence la présence d'une protéine encore non identifiée ayant une

fonction régulatrice sur les CLMr, en parallèle à ROCK et MRCK. Ils supposent qu'il pourrait s'agir d'une MLCK (myosin light chain kinase) (Wilkinson, Paterson et Marshall, 2005). Cette hypothèse a été vérifiée chez le nématode, avec l'homologue le plus près de MLCK, le gène ZC373.4. Ce dernier ne se positionne pas en parallèle à LET-502 ou MRCK (Gally *et al.*, 2009). PAK-1 serait la kinase permettant la phosphorylation des CLMr en parallèle de LET-502 et MRCK (Gally *et al.*, 2009). Par contre, ces résultats n'écartent pas la possibilité qu'une quatrième kinase puisse fonctionner en parallèle à LET-502 et MRCK, afin de pallier leur absence simultanée (Gally *et al.*, 2009). Chez *C. elegans*, aucune MLCK n'a été établie à ce jour pour avoir une fonction au cours du processus d'élongation.

Une mutation perte de fonction (null ou hypomorphe) de *mel-11*, conduit à un phénotype d'hypercontraction entraînant la rupture des embryons au stade plié 1,5 fois (Diogon *et al.*, 2007), alors qu'une mutation perte de fonction (null ou hypomorphe) de *let-502* conduit à un phénotype d'hypocontraction et les embryons ne s'allongent pas au-delà du stade plié 1.5 fois (Diogon *et al.*, 2007).

### 1.5.7 RÉGULATION DE LA FORMATION DES CORPS DENSES

Les corps denses sont des structures très similaires en composition aux adhésions focales des mammifères. Ils se composent d'intégrine, de perlecan, de vinculine, d' $\alpha$ -actinine et de taline. Les corps denses sont nécessaires pour la transduction des forces de contraction musculaire à l'appareil contractile d'actine-myosine de l'épiderme. Les mutations altérant l'assemblage des sarcomères ou l'ancrage de l'appareil contractile d'actine-myosine à la membrane des cellules musculaires cause un arrêt d'élongation au stade plié 2-fois dû à une paralysie musculaire (Hresko, Williams et Waterston, 1994 ; Williams et Waterston, 1994). Ce phénotype est appelé PAT. Les mutants des intégrines  $\alpha$  et  $\beta$  (PAT-2 et PAT-3) présentent ce phénotype d'élongation altérée.

### 1.5.8 LA SIGNALISATION DES GTPASES RHOS LORS DE L'ÉLONGATION EMBRYONNAIRE

Considérant les processus cellulaires sous-jacents à l'étape morphogénique d'élongation et les joueurs moléculaires y participant, il n'est pas étonnant de voir que les GTPases Rhos y jouent un rôle essentiel. Toutes les GTPases Rhos de *C. elegans* jouent un rôle durant son développement. Leur fonction est d'ailleurs souvent redondante avec d'autres GTPases. Rho-1 est engagée dans les étapes précoces du développement, soit dans la cytokinèse (Jantsch-Plunger *et al.*, 2000), et semble plus tardivement responsable de l'intégrité de l'épiderme. Les gènes *mel-11* et *let-502* participent à ces processus en aval de *rho-1* aux étapes précoces du développement (Piekny et Mains, 2002), mais aussi durant l'élongation (Piekny, Wissmann et Mains, 2000). En effet, MEL-11 et LET-502 ont des fonctions antagonistes durant l'élongation. MEL-11 inhibe les contractions de l'appareil contractile d'acto-myosine, alors que LET-502 favorise les contractions. La GTPase MIG-2, a été décrite pour fonctionner en amont de la voie de MEL-11 et pour avoir une fonction inhibitrice de la contraction. La GEF UNC-73, a été positionnée en parallèle à MEL-11 et régulerait négativement l'activation de MLC-4. Dans ce processus, la fonction de MIG-2 est donc antagoniste à la fonction de RHO-1 (Piekny, Wissmann et Mains, 2000). La GEF UNC-73 est une GEF pour RHO-1, CED-10 et MIG-2, et ceci indique une possible redondance ou complémentarité de ces GTPases. Or, l'allèle *unc-73 (rh40)* utilisée dans l'étude de Piekny est une mutation ponctuelle inactivant l'activité GEF de *unc-73* vis-à-vis des Rac, mais pas de Rho-1. (Piekny, Wissmann et Mains, 2000). Il a précédemment été signalé que la mutation de UNC-73 (nulle) aggrave plus fortement le phénotype de *mel-11* que la mutation de *mig-2* (nulle), ce qui implique que UNC-73 ne peut pas agir uniquement via MIG-2 (Wissmann, Ingles et Mains, 1999). Les études épistatiques effectuées à ce jour ne permettent pas d'affirmer qu'UNC-73 n'active pas la GTPase MIG-2 (Piekny, Wissmann et Mains, 2000). Si tel était le cas, UNC-73 serait impliquée à la fois en amont et en parallèle de MEL-11 puisque UNC-73 aggrave le phénotype du double mutant *let-502/mel-11* alors que *mig-2* ne le fait pas. Par contre, UNC-73 activerait soit CED-10 soit RAC-2 lors de ces processus. La surexpression d'une forme constitutivement active de CED-10 induit un défaut d'élongation similaire à ceux induits par les mutations réductions de fonction de *let-502* (Pedone *et al.*, 2008). Ceci suggère que CED-

Gene	Not	Osm	Octanol avoidance	Learning	Forward movement	Glutamate-gated current
<i>gir-1</i>	+	++	Defective	Defective	Increased	Non-NMDA- component absent
<i>gir-2</i>	++	++	ND	ND	ND	Non-NMDA- component reduced
<i>nmr-1</i>	++++	+++	ND	ND	Increased	NMDA- component absent

Phenotype of *gir-1*, *gir-2* and *nmr-1* mutants. + indicates the response to nose touch (Not) or osmotic stimuli (Osm) compared to wild-type where —++ represents wild-type behavior. ND, not determined.

### 1.6.2 MÉCANISMES DE LOCALISATION DE GLR-1

Déjà plusieurs protéines ont été identifiées pour affecter la localisation de GLR-1. GLR-1 est un récepteur au glutamate dont l'adressage aux densités post-synaptiques dépend, entre autres, de son interaction avec des protéines possédant un domaine PDZ (Rongo *et al.*, 1998).

La CAMKII, UNC-43, est responsable de l'adressage de GLR-1 aux membranes post-synaptiques et serait comprise dans la formation de nouvelles synapses (Rongo et Kaplan, 1999). Chez les mammifères, les membres de la cascade Calmoduline Kinase (CAMKII/CAMKK/CAMK1) forment un complexe avec GIT-1 et  $\beta$ -PIX et déterminent une voie de signalisation moléculaire qui relie l'activité neuronale à la formation de nouvelles synapses (Saneyoshi *et al.*, 2008).

Chez *C. elegans*, le trafic et le recyclage du récepteur GLR-1 sont régulés par la voie d'endocytose clathrine-dépendante et la voie du protéasome ubiquitine-dépendante (Burbea *et al.*, 2002). Le complexe APC (Anaphase promoting complex), qui est en fait une ubiquitine ligase, contrôle aussi l'accumulation des récepteurs GLR-1 aux membranes post-synaptiques (Juo et Kaplan, 2004). De manière intéressante, les nématodes mutants pour les gènes de ces diverses machineries, présentent tous un comportement de forage altéré. Ainsi, les mutants pertes de fonction de la machinerie de dégradation ou d'endocytose présentent un taux de recul plus élevé (Figure 1-29) (Burbea *et al.*, 2002 ; Juo et Kaplan, 2004). Ce comportement de forage est donc un excellent marqueur pour identifier une altération de la signalisation glutamatergique.

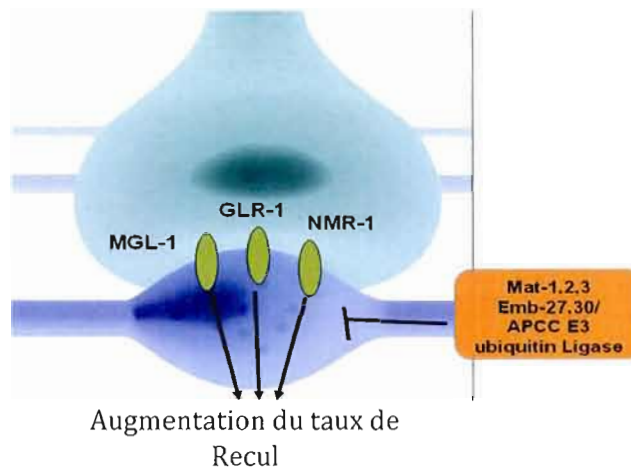


FIGURE 1-29 COMPORTEMENT DE FORAGE ET SIGNALISATION GLUTAMATERGIQUE. Le comportement de forage est contrôlé par la neurotransmission glutamatergique et requiert l'activité de NMR-1, GLR-1 et MGL-1. Les allèles perte ou réductions de fonction de ces gènes conduisent à une réduction de la fréquence de recul. Aussi, l'altération de la machinerie d'endocytose clathrine-dépendante résulte en une augmentation du taux de recul.

### 1.6.3 LE COMPORTEMENT DE FORAGE

Vu le rôle de GIT/PIX/PAK au niveau des neurones de l'hippocampe, il est intéressant de confirmer le rôle de ce complexe dans les événements de plasticité synaptique chez le nématode. On se souvient que le complexe régule potentiellement le ciblage d'AMPA aux membranes post-synaptiques chez les mammifères. PIX-1 possède un domaine d'interaction avec le domaine PDZ de Shank (Park *et al.*, 2003), une protéine permettant l'assemblage des densités post-synaptiques et l'adressage des récepteurs NMDA et AMPA, chez les mammifères (Baron *et al.*, 2006 ; Boeckers, 2006 ; Roussinol *et al.*, 2005). L'équivalent de Shank chez *C. elegans*, *shn-1*, présente des phénotypes comportementaux altérés typiques d'un défaut de signalisation neuronale, soit des troubles de pharynx, de défécation et de mouvement rythmique (Jee *et al.*, 2004 ; Oh *et al.*, 2006). De plus, PIX-1 forme chez les mammifères un complexe de signalisation avec les Cam Kinase qui, chez le nématode tout comme chez les mammifères, joue un rôle dans la formation des synapses. Finalement, GIT et PAK possèdent une fonction neuronale chez *C. elegans* (section 1.4.7). GLR-1 est l'homologue de AMPAR chez *C. elegans* et est impliqué dans l'établissement de la PLT, une

forme de plasticité synaptique (Lynch, 2004). Le mécanisme conduisant à la PLT n'est pas complètement résolu, en partie parce que la PLT est régie par des mécanismes multiples. La PLT dépend, entre autres, d'une meilleure communication et est principalement établie par l'amélioration de la sensibilité de la cellule post-synaptique aux signaux reçus de la cellule présynaptique (Malenka et Bear, 2004). En effet, la PLT améliore la sensibilité de la cellule post-synaptique en augmentant, à la membrane, l'activité et le nombre de ses récepteurs de neurotransmetteurs (Malenka et Bear, 2004).

Les comportements de forage en Zone de Recherche Restreinte (RZR) et de dispersion, sont contrôlés par la signalisation glutamatergique et dopaminergique (Hills, Brockie et Maricq, 2004). Le comportement de recherche de nourriture RZR consiste en une augmentation du taux de recul et du nombre de tours d'un animal immédiatement après qu'il ait été en contact avec une source de nourriture. Le comportement de dispersion, en absence de nourriture, consiste en l'augmentation de la zone de recherche et donc en une réduction du taux de recul et du nombre de tours. Les mutants perte de fonctions *glr-1* montrent un taux de reculs réduit, alors que les mutants gain de fonction présentent un taux de reculs significativement plus élevé lors du forage en RZR (Hills, Brockie et Maricq, 2004).

Huit neurones se sont révélés être inclus dans le contrôle du taux de recul. Parmi eux, trois ont des effets inhibiteurs sur le recul : AIY, RIM et l'ASI. Les cinq autres, soit AWC, ASK, AIB, RIB et AVA, favorisent le mouvement de recul au cours du comportement de recherche de nourriture (Figure 1-30) (Gray, Hill et Bargmann, 2005). L'homologue du récepteur AMPA chez *C. elegans*, GLR-1 est exprimé dans les interneurones AVA, AVB, AVD, AVE et PVC, mais aussi dans les neurones AIB, MDM, RIM, SMD, AVG, AVJ, DVC, PVQ, RIG, RIS, RMD et RMEL / R. Il est présent à un degré moindre dans les neurones AVG, PVQ et URY (Maricq *et al.*, 1995).



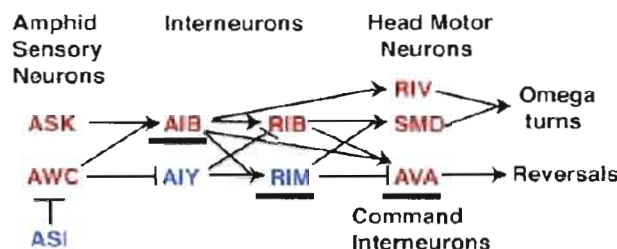


FIGURE 1-30: NEURONES CONTRÔLANT LE COMPORTEMENT DE FORAGE. Les neurones en rouge ont un effet inhibiteur sur le reculon et les neurones en bleu régulent positivement le taux de reculons. Les neurones soulignés (RIM, AIB et AVA) expriment GLR-1 Tiré de (Gray, Hill et Bargmann, 2005).

## 1.7 OBJECTIFS DE L'ÉTUDE ET HYPOTHÈSES

### 1.7.1 HYPOTHÈSES

Connaissant la fonction et les partenaires moléculaires de GIT/PIX/PAK chez les mammifères, ainsi que la fonction de ces partenaires moléculaires chez *C. elegans*, nous voulons confirmer la conservation fonctionnelle du complexe chez le nématode. Donc, considérant la conservation potentielle des machineries nécessaires à la motilité cellulaire (intégrines, Rho, CLMr) et à l'adhésion (intégrines, cadhérine, caténine, scribble), ainsi que l'implication de ces dernières dans les étapes d'élongation de l'embryon chez le nématode, nous supposons que GIT/PIX/PAK participent à ce processus morphogénique. Nous tenterons d'élucider les voies de signalisation impliquant GIT/PIX/PAK lors de l'élongation embryonnaire en utilisant une approche génétique.

De plus, nous tenterons de mettre en évidence la fonction neuronale du complexe chez le nématode. Déjà, une fonction neuronale a été identifiée pour GIT-1 et PAK-1. Nous supposons que le complexe GIT/PIX/PAK puisse jouer un rôle chez le nématode dans l'adressage des récepteurs neuronaux, tels que GLR-1. Pour confirmer cette fonction, nous étudierons les comportement rythmés des nématodes présentant des mutations pour *pix-1*, *git-1* et *pak-1*.

### 1.7.2 OBJECTIFS

L'étude visait les objectifs suivants :

1. Caractérisation des phénotypes développementaux résultant de l'altération génétique de *pix-1*, *git-1* et *pak-1*;
2. Positionnement de *pix-1*, *git-1* et *pak-1* dans les voies de signalisation contrôlant l'élongation embryonnaire;
3. Identification des intégrines (*ina-1*) comme partenaires fonctionnels de *pix-1*, *git-1* et *pak-1* au cours de l'élongation embryonnaire;
4. Identification des GTPases impliquées dans les fonctions de *pix-1*, *git-1* et *pak-1* au cours de l'élongation embryonnaire;
5. Identification d'altérations de comportement associées aux mutations de *pix-1*, *git-1* et *pak-1*;
6. Identification de l'origine moléculaire des altérations comportementales associées aux mutations dans *pix-1*, *git-1* et *pak-1*.

### 1.7.3 CONTRIBUTIONS

Les résultats générés par cette étude devraient permettre d'éclairer la fonction, à ce jour non-élucidée, de *git-1*, *pix-1* et *pak-1* chez le nématode *C. elegans*. De plus, l'étude d'un complexe qui intègre les signaux cellulaires de différentes familles de GTPases nous permettra d'élargir notre compréhension de ces mécanismes complexes de signalisation cellulaire coordonnés par les GTPases. Notre étude permettra, de plus, l'examen de ces mécanismes de coordination dans un contexte multicellulaire, ce qui est extrêmement difficile dans les organismes plus complexes tels que la souris.

Le comportement de recherche de nourriture de *C. elegans* repose en partie sur des mécanismes très similaires à la LTP, qui est montrée chez les mammifères pour être responsable des apprentissages et de la mémoire. Disséquer les mécanismes biologiques sous-jacents au comportement de forage pourrait permettre d'identifier les mécanismes

pathologiques et les acteurs moléculaires à l'origine de l'établissement et du maintien des apprentissages chez les mammifères. L'étude de la fonction du complexe GIT/PIX/PAK dans les événements de plasticité synaptique devrait permettre d'accroître notre compréhension de ces phénomènes.

## CHAPITRE 2

### MATÉRIEL ET MÉTHODE

#### 2.1 MÉTHODES STANDARDS

##### 2.1.1 CULTURE DE *C. ELEGANS*

Les nématodes ont été maintenus sur le nematode growth medium (NGM) (1mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM MgSO<sub>4</sub>, 1mM K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH6.0, Cholestérol 50ug/L, Agar 15g/L, Extrait de Levure 2.5g/L, NaCl 3g/L) (Brenner 1972) avec la souche d'*Escherichia coli* OP50 comme source de nourriture. Typiquement, les souches de *C. elegans* sont maintenues en croissance à 18°C et conservée à l'état d'adulte à 15°C, sauf indication contraire. N2 Bristol a été utilisé comme souche sauvage. La liste des allèles, des souches et des transgènes utilisés et générés pour cette étude est contenue dans la Table 2-1.

TABLE 2-1 : LISTE DES SOUCHES UTILISÉES OU GÉNÉRÉES POUR CETTE ÉTUDE.

Souches	Génotype	Source
N2	<i>wt</i>	CGC
VC863	<i>pix-1 (gk416)X</i>	CGC
VC651	<i>pix-1 (ok982) X</i>	CGC
RB689	<i>pak-1 (ok448)X</i>	CGC
RB1540	<i>git-1 (ok1848)X</i>	CGC
KP4	<i>glr-1(n2461)III</i>	CGC
VC259	<i>pak-2(ok332) V</i>	CGC
VM487	<i>nmr-1(ak4) II</i>	CGC
HJ1	<i>max-2(cy2) II; oxIs12 X</i>	CGC
NG144	<i>ina-1(gm144) III</i>	CGC
RW3568	<i>pat-6(st561)/dpy-9(e12)IV</i>	CGC
VC1012	<i>+/mT1 II; pxl-1(ok1483)/mT1[dpy-10(e128)] III</i>	CGC
HR604	<i>mel-11 (it26) unc-4(e120)/mnC1 II</i>	Paul Mains
HR1237	<i>mel-11(it26) unc-4 (e120)II; let-502 (sb118)I</i>	Paul Mains
HR1157	<i>let-502 (sb118)I</i>	Paul Mains
RB907	<i>C11D9.1(ok772) I</i>	CGC
NG2517	<i>him-5(e1490) V; gmls5</i>	CGC
BC8553	<i>dpy-5(e907) I ; PIX-1::mCherry</i>	Baillie/SH
BC15420	<i>dpy-5(e907) I; git-1::gfp</i>	Baillie
GLR-1 ::GFP	<i>glr-1::gfp</i>	Baillie
JS1-9	<i>pix-1 (gk416)X ; glr-1::gfp</i>	SH
JS12-13	<i>pix-1 (gk416)X; him-5(e1490) V; gmls5</i>	SH
JS15	<i>pix-1 (gk416)X; let-502 (sb118)I</i>	SH
JS16	<i>pix-1 (gk416)X; mel-11 (it26) unc-4(e120)II</i>	SH
JS17	<i>pix-1 (gk416)X; let-502 (sb118)I; mel-11 (it26) unc-4(e120)II</i>	SH
JS18	<i>pak-1 (ok448)X; mel-11 (it26) unc-4(e120)II</i>	SH
JS19	<i>pak-1 (ok448)X; let-502 (sb118)I</i>	SH
JS20	<i>pak-1 (ok448)X; let-502 (sb118)I; mel-11 (it26) unc-4(e120)II</i>	SH

## 2.1.2 GÉNÉRATION DE MÂLES

Pour accroître la proportion de mâles disponibles dans la population, 20 à 40 hermaphrodites au stade jeune adulte ont été déposés sur une plaque de NGM agar et incubés 6h ou 16h à 30°C. Les mâles ont subséquemment été propagés en croisant 20 mâles avec 30 hermaphrodites au stade L4

### 2.1.3 CROISEMENT

Pour les études génétiques, les croisements entre 3 mâles et 2 hermaphrodites ont été effectués dans un puit d'une plaque de 24 puits contenant du NGM agar et une source de nourriture, soit les OP50

### 2.1.4 GÉNOTYPAGES

Pour génotyper la progéniture d'un croisement et identifier la présence des allèles mutants *pix-1(gk416)*, *pix-1(ok982)*, *git-1(ok1848)*, *pak-1(ok448)*, *ina-1(gm-144)*, 10 vers au stade L3 ont été piqués dans 10µl de solution de lyse (Tris-HCl pH 9.0 10mM, KCl 50mM, MgCl<sub>2</sub> 2mM, Triton X100 0.1%, Protéinase K 100ug/ml). Afin de faciliter la lyse, la cuticule est craquée par deux cycles congélation/décongélation à -80°C, suivis d'une incubation à 65°C 1h, 95°C 15 minutes. Une réaction de polymérase en chaîne (PCR) est effectuée dans 3µl de mélange réactionnel (Tris HCl pH9.0 10mM, KCl 50mM, MgCl<sub>2</sub> 2mM, Triton X100 0,1%, Amorce 0,4µM, DNTP 0,2mM et 1µl Taq polymérase dans un volume final de 20µl) et selon le programme suivant : dénaturation 95°C, 3 minutes, [95°C 45s, 60°C 30s, 72°C 1minute/kpb] pour 30 cycles, 72°C 7minutes. Les amplicons sont visualisés suite à une migration sur gel d'agarose et les allèles sont ségrégués selon la taille des amplicons. Les allèles dont les mutations sont inconnues ou non-différenciables par PCR sont sélectionnés par phénotype.

TABLE 2-2 : AMORCES POUR LE GÉNOTYPAGE

Gène Cible		Séquence 5'-3'	Amplicon WT/mutant (pb)
<i>pix-1</i> ( <i>gk4116</i> )	F	TCACCCGTTCTATCGATTCC	1726/1135
	R	GCCGATCCACGTTGTAAATC	
<i>pix-1</i> ( <i>ok982</i> )	F	CGAGAGGTACTACAACCTTGC	1990/988
	R	ATTTGTTAGGTCGTCGGTCG	
<i>pak-1</i> ( <i>ok448</i> )	F	GCGGTAGCAGTTGAGTCATC	1803/500
	R	TCTTTCTAAGCCTGGAGAGG	
<i>git-1</i> ( <i>ok1848</i> )	F	ACACGTTCCGAACCTTTCAC	3329/2000
	R	TTCTCCGTTGTTTTCCCAAG	

### 2.1.5 SYNCHRONISATION À L'HYPPOCHLORITE

Une population d'adultes capables de pondre est flottée avec 1ml de M9 (47mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O, 22mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 85mM NaCl, 1mM MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O) et centrifugée à 3 minutes à 3500rpm. Les vers sont de nouveau suspendus dans 1ml de solution d'hypochlorite (Hypochlorite de Sodium 0.8%, NaOH 0,5M) et sont dissouts pour une période de 4 minutes avant d'être centrifugés 3 minutes à 3500rpm. Le culot d'œufs est lavé 4 fois avec du M9. Les œufs sont ensuite incubés 16 h dans du M9 sans nourriture et sous agitation à 18°C afin de synchroniser la population au stade L1.

### 2.1.6 MICROSCOPIE

Les vers sont montés sur un coussin d'agarose 2% dans une solution de Levamisole 2mg/ml. Les vers sont visualisés en utilisant un microscope Leica DM5500 équipé d'un objectif à immersion à l'huile de 63X ou 100X et un oculaire de 10X. La morphologie des embryons est observée sous illumination DIC (differential interference contrast). Les protéines fluorescentes rouges et vertes sont observées par microscopie à fluorescence.



## 2.2 BIOLOGIE MOLÉCULAIRE : GÉNÉRATION DES OUTILS POUR L'ÉTUDE

### 2.2.1 GÉNÉRATION DE L'ORF DE *PIX-1*

D'après les données de SAGE, l'ARNm de *pix-1* est plus abondant durant le développement embryonnaire. Par contre, à cause de la difficulté de lyse des embryons, le second stade où l'expression de *pix-1* est suffisamment abondante est le stade larvaire L3-L4. Une population de N2 au stade L3-L4 a été lysée par Trizol (Invitrogen, Burlington, ON). Brièvement, de trois pétris de 6cm contenant une population synchronisée, les nématodes ont été flottés avec 1ml de M9 et lavés à trois reprises par des centrifugations successives de 3 minutes à 3500rpm. Le culot de nématode a été suspendu dans 1ml de Trizol (Invitrogen, Burlington, ON) et congelé à -80°C. Le mélange a subi deux cycles de congélation/décongélation avant d'être vortexé jusqu'à dissolution des carcasses de nématodes. La séparation de phase a été effectuée en ajoutant 0.2ml de chloroforme, suivie d'une agitation et d'une incubation de cinq minutes à 22°C, ainsi que d'une centrifugation de 10 minutes à 12 000xg à 4°C. Le surnageant contenant l'ARN est récupéré. L'ARN est précipité avec 0.5ml d'isopropanol suivi d'une incubation de 10 minutes à 22°C et d'une centrifugation de 10 minutes à 12 000xg à 4°C. L'ARN est ensuite lavé avec 1ml d'éthanol 75% et centrifugé cinq minutes à 7500xg à 4°C. L'ARN est finalement suspendu dans de l'eau traitée au DEPC (diethyl pyrocarbonate). La qualité de l'ARN est évaluée par une migration sur gel d'agarose pour mesurer le ratio 18S/28S et par calcul du ratio A260/A280. À partir de cet ARN, une transcription inverse (TI) est effectuée avec les amorces spécifiques Gateway suivantes (Alpha DNA, Montréal, Qc) (voir Table 2-3).

TABLE 2-3 : SÉQUENCE DES AMORCES GATEWAY POUR L'ORF DE *PIX-1*

Gène	Séquence 5'-3'
Cible	
<i>pix-1</i>	F GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGAACCTGTTTCGGGT
	R GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACAAGTCAAACGAGTTAGAT
	CTC CTT

Caractères gras: séquence Gateway, caractères normaux: séquence *pix-1*



La réaction de transcription inverse a été effectuée dans les conditions suivantes : 0.1µM d'amorce spécifique, 1mM DNTP (Invitrogen, Burlington, ON), 1000ng ARN et 8µl d'eau traitée au DEPC. La réaction a été faite selon les instructions du fabricant en utilisant la Superscript II (Invitrogen, Burlington, ON), la RNase OUT (Invitrogen, Burlington, ON) et la RNase H (Invitrogen, Burlington, ON). L'ADNc généré a ensuite été amplifié par PCR en utilisant la PFX platinum Taq polymerase (Invitrogen, Burlington, ON), selon les instructions du fabricant. Le cycle pour la réaction PCR est représenté à la Table 2-4. L'ORF amplifié est nettoyé avec le kit QiaQuick PCR Purification (Qiagen, Mississauga, ON) et cloné par recombinaison Gateway dans un vecteur pDONR201 avec la BP clonase (Invitrogen, Burlington, ON).

TABLE 2-4 : CONDITIONS PCR POUR L'AMPLIFICATION DE L'ORF DE *pix-1*

Étape		Température	Temps
1	Dénaturation	94°C	5 min
2	Dénaturation	94°C	40s
3	Hybridation	50°C	30s
4	Élongation	68°C	90s
5	Cycle des étapes 2 à 4 répété 4 fois		
6	Dénaturation	94°C	40s
7	Hybridation	51°C+ 1°C/cycle	30s
8	Élongation	68°C	90s
9	Cycle des étapes 6 à 8 répété 14 fois		
10	Dénaturation	94°C	40s
11	Hybridation	65°C	30s
12	Élongation	68°C	90s
	Cycle des étapes 10 à 12 répété 14 fois		
13	Élongation	68°C	5min

### 2.2.2 CLONAGE DES ORFS POUR LA PRODUCTION D'ARN DOUBLE BRIN

Les ORFs de *git-1*, *ina-1*, *pak-1*, *mig-2*, *rac-1*, *ced-10*, *cdc-42*, *rho-1*, *rac-2* et *crp-1* ont été gracieusement offerts par le Dr Marc Vidal (Dana Farber Cancer Institute, Harvard medical School, Boston). Les constructions suivantes ont préalablement été générées : pL4440-dest-*mig-2*, *rac-1*, *ced-10*, *cdc-42*, *rho-1*, *rac-2* et *egfp* (Caruso *et al.*, 2005). Les constructions suivantes ont été générées pour cette étude, selon la méthode précédemment utilisée (Caruso *et al.*, 2005) : pL4440-dest-*pak-1*, *dgn-1*, *ina-1*, *git-1*, *pix-1*. Brièvement, les ORFs ont subi une recombinaison LR du vecteur pDONR201 vers le vecteur pL4440-dest. Ces constructions ont été transformées dans la souche HT115 (DE3) (Timmons, Court et Fire, 2001) et sélectionnées sur Ampicilline 100µg/ml et Tétracycline 12.5µg/ml.

## 2.3 GÉNÉRATION DE TRANSGÉNIQUES

### 2.3.1 GÉNÉRATION DE FOSMIDES MODIFIÉS

Les vers transgéniques exprimant la protéine PIX-1 en fusion traductionnelle avec la protéine fluorescente mCherry ont été générés en utilisant la méthode de Dolphin et Hope (Dolphin et Hope, 2006). Brièvement, le fosmide WRM0622aH06 contenant la séquence cible K11E4.4 (*pix-1*) a été obtenu du Dr David Baillie (Simon Fraser University, BC). La cassette de recombinaison rpsL-TetA (C) (Stavropoulos et Strathdee, 2001) a été amplifiée par PCR avec la platinum HIFI Taq polymérase (Invitrogen, Burlington, On), avec les amorces de la Table 2-5. La cassette de recombinaison mCherry a été amplifiée à partir du plasmide pPD49.83, (gracieusement offert par Dr Richard Roy (Université McGill, Biologie, Montréal) par PCR en utilisant les amorces de la table 2-5. La recombinaison a été effectuée telle que décrite (Lee *et al.*, 2001 ; Yu *et al.*, 2000). Les conditions PCR sont identiques à celles décrites par Dolphin et Hope (Dolphin et Hope, 2006).

TABLE 2-5 : AMORCES POUR LA RECOMBINAISON

Cible		Séquence 5'-3'
Cassette rpsL- TetA	F	GGG AGT TCC AGT ACT CCA AGA AAG GAG ATC AAC TCG TTT GAC TTG TCGCTGTCGAG ATATGACGGTG
	R	GTA ATT TCT AGC GCT CTC ACT CAT TCG AGA AAA CGC TTT CAA CTA GTT TA GAT GAT AAG CTG TCA AAC ATG AG
Cassette mCherry	F	CCA GAT GGG AGT TCC A GT ACT CCA AGA AAG GAG ATC AAC TCG TTT GAC TTG ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG G
	R	GTA ATT TCT AGC GCT CTC ACT CAT TCG AGA AAA CGC TTT CAA CTA GTT TA CTT GTA CA G CTC GTC CAT GCC

Caractère gras: 50bases de part et d'autre du codon stop de *pix-1*, caractère normal : bases reconnaissant la cassette rpsL-TetA ou mCherry

### 2.3.2 INJECTION DES FOSMIDES MODIFIÉS

Les fosmides modifiés ont été injectés dans le Laboratoire du Dr Baillie (Simon Fraser University, Burnaby, BC). Les vers *dpy-5* ont été co-injectés avec 10ng/μl de WRM0622aH06-pix-1:mCherry et 100ng/μl de pCeh361 (rescue *dpy-5*). Les vers ayant intégré les fosmides modifiés sont sélectionnés dans la progéniture de première génération selon l'expression de mCherry et l'abrogation du phénotype *dpy-5*.

## 2.4 CARACTÉRISATION PHÉNOTYPIQUE ET ALLÉLIQUE

### 2.4.1 LÉTALITÉ EMBRYONNAIRE ET LARVES NON-ALLONGÉES

Afin de quantifier la létalité embryonnaire (Emb) et les larves non-allongées (NaLv), une population d'adultes est synchronisée à l'hypochlorite. Les larves (20) synchronisées sont déposées en triplicata sur une plaque de 24 puits contenant du NGM agar inoculé avec des OP50 comme sources de nourriture et sont laissées à 18°C ou 25.5°C pour une période de 72h. Les vers adultes pondent pour une période de six heures avant d'être flottés par 5 lavages successifs avec 1ml de M9. Le nombre total d'œufs est compté puis, 24 h plus tard, les œufs n'éclosant pas sont décomptés. Le rapport œufs morts/total œufs permet d'obtenir la quantification du phénotype Emb. Les larves ayant éclos sont laissées 24 heures

supplémentaires à 18°C ou 25.5°C pour se développer avant de faire le décompte des larves non-allongées (NaLv). Le rapport NaLv sur le nombre total d'œufs ayant éclos permet de quantifier le phénotype de NaLv.

#### 2.4.2 CONTRACTION DU PHARYNX

À partir d'une population synchronisée de nématodes, les larves non-allongées sont repérées à l'aide d'un microscope à dissection avec un grossissement de 100X et sont observées avec un grossissement de 400X. Le nombre de contractions du pharynx est compté sur une période de 20 secondes et les résultats sont rapportés en nombre de contractions par minute. Le taux de contractions du pharynx est mesuré de manière identique pour les larves au stade L3 qui servent de contrôle.

#### 2.4.3 TAUX DE PONTE

Le taux de ponte a été obtenu par deux méthodes en parallèle. Premièrement, une population synchronisée de jeunes adultes est déposée sur une plaque de NGM agar, avec OP50 comme source de nourriture, et la population pond pour une période de 5 ou 12 heures. Les adultes sont enlevés, le nombre d'œufs est compté et le taux de ponte est présenté en nombre d'œufs/vers/heure. Deuxièmement, de jeunes adultes provenant de la même population sont flottés, montés sur un coussin d'agar et paralysés avec du  $\text{NaN}_3$  125mM. Le nombre d'œufs accumulés à l'intérieur des vers est compté et les résultats sont exprimés en nombre d'œufs/vers, suite à une observation sous un microscope avec illumination DIC (Leica DM5500). Ces expériences ont été répétées à 2 reprises.

#### 2.4.4 TAUX DE DÉFÉCATION

Une population de nématodes est synchronisée par traitement à l'hypochlorite. Les vers au stade jeune adulte sont visualisés avec un microscope à dissection à un grossissement de 100x. Le temps entre deux contractions de l'anus est comptabilisé pour 10 contractions sur 10

vers différents. N2 bristol est utilisé comme contrôle. Les résultats sont représentatifs de 25 mesures pour chaque souche.

#### 2.4.5 CARACTÉRISATIONS ALLÉLIQUES

L'allèle *git-1 (ok1848)* n'ayant pas préalablement été caractérisé, nous avons procédé à l'identification de la mutation. *git-1 (ok1848)* comporte une délétion de 1000 nucléotides. L'ADN génomique a été amplifié avec les amorces de la table 2-6.

TABLE 2-6 : AMORCE DE L'IDENTIFICATION DE LA DÉLÉTION DE *git-1(ok1848)*

Cible		Séquence 5'-3'
<i>git-1 (ok1848)</i>	F	TTC TCC GTT GTT TTC CCA AG
	R	ACA CGT TCC GAA CCT TTC AC

La réaction de polymérase en chaîne (PCR) est effectuée sur 3µl d'ADN génomique obtenu tel que mentionné à la section 2.1.4, avec la Taq polymérase Platinum HiFi (Invitrogen, Burlington, ON), selon les conditions spécifiées par le fabricant. Le cycle PCR utilisé est rapporté dans la Table 2-7. L'amplicon a migré sur gel d'agarose, puis la bande a été extraite et nettoyée à l'aide du kit QiaQuick Gel Extraction (Qiagen, Mississauga, ON), selon les instructions du fabricant. L'échantillon a été séquencé au centre d'innovation de l'Université McGill et Génome Québec.

TABLE 2-7 : CYCLES PCR POUR L'AMPLIFICATION DE *git-1 (ok448)*

Étape	Processus	Température °C	Temps
1	Dénaturation	94	3min
2	Dénaturation	94	45s
3	Hybridation	60	30s
4	Élongation	68	2min
5	Cycle de l'étape 2 à 4 répété 34 fois		
6	Élongation	68	7min

Les outils bioinformatiques suivants ont été utilisés pour identifier la position de la délétion, la protéine mutée correspondante ainsi que les domaines protéiques présents dans la zone délétère : Worm Blat ([wormbase.org](http://wormbase.org)), blastp, blastn, CDD, Cobalt ([www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/)) et Smart ([smart.org](http://smart.org)). Les mutations (délétions) sur les allèles de *pix-1 (gk416)*, *pix-1 (ok982)* et *pak-1 (ok448)* étant déjà connues, seuls Smart et ClustalW ont été utilisés respectivement pour identifier les domaines conservés et pour confirmer la présence de certains domaines.

Afin d'évaluer la nature (récessive, dominante) de ces allèles, le phénotype mutant a été quantifié pour les nématodes hétérozygotes. Pour ce faire, les mutants sont croisés avec des nématodes sauvages et le phénotype est quantifié dans la progéniture de première génération (100% hétérozygote) ou pour la progéniture de deuxième génération provenant d'un hermaphrodite hétérozygote (25% *wt*, 25% homozygote mutant, 50% hétérozygote).

#### 2.4.6 MICROSCOPIE DYNAMIQUE À QUATRE DIMENSIONS

Les hermaphrodites au stade adulte sont flottés avec du M9 et transférés dans un verre de montre où ils sont disséqués avec une aiguille de 25G, afin de libérer les embryons. Les embryons sont déposés sur un coussin d'agar, sur une lame de microscope. Une lamelle est déposée sur les embryons et est scellée avec de la gomme arabique. Le développement embryonnaire entre le stade coma et 3 plis est filmé à 25°C avec un microscope Leica DM5500 équipé d'un objectif à immersion à l'huile de 63x sous éclairage DIC par

intervalles de deux minutes. Le développement embryonnaire est visualisé avec le programme Leica AF6000. Pour l'analyse des temps d'élongation, le stade coma est considéré comme le temps 0. L'élongation d'au moins 20 œufs a été filmée.

## 2.5 INTERACTIONS GÉNÉTIQUES ET CHIMIO-GÉNÉTIQUES

### 2.5.1 GÉNÉRATION DE DOUBLES ET TRIPLES MUTANTS

Afin d'étudier les interactions génétiques entre *pix-1* (*gk416*) et *pak-1* (*ok448*) avec *mel-11* (*it26*) et *let-502* (*sb118ts*), des mâles *pix-1* ou *pak-1* ont été générés tels que décrit précédemment et croisés avec des hermaphrodites *mel-11* (*it26*), *let-502* (*sb118ts*) ou *mel-11*(*it26*); *let-502* (*sb118ts*). Les phénotypes Emb et NaLv ont été déterminés tels que décrit précédemment à 18°C et 25.5°C. La souche *pix-1*(*gk416*);*mel-11*(*it26*) est maintenue à 15°C et 18°C. La souche *pix-1*(*gk416*);*let-502*(*sb118ts*) et la souche *pix-1*(*gk416*); *mel-11*(*it26*); *let-502*(*sb118ts*) sont maintenues à 18°C. Toutes les souches doubles et triples mutants de *pak-1* doivent être maintenues à 15°C.

### 2.5.2 TRAITEMENTS AVEC INHIBITEURS CHIMIQUES

Afin d'évaluer si *pix-1*, *git-1* et *pak-1* participent à des voies de signalisation conduisant à la phosphorylation des chaînes légères de myosines régulatrices (CLMr) durant les processus d'élongation, nous avons traité les mutants avec divers inhibiteurs de la machinerie de phosphorylation des CLMr. Pour ce faire, nous avons traité une population de nématodes synchronisée à l'hypochlorite à partir du stade L1 jusqu'au stade adulte avec la blebbistatine (Sigma- Aldrich, Oakville, On) 50 et 100µM, ML-7 (Sigma-Aldrich, Oakville, On) 2µM et la calyculin A (Sigma-Aldrich, Oakville, On) 100nM. La population d'adulte est laissée sur le milieu contenant l'inhibiteur pour pondre. Le phénotype de NaLv est évalué tel que décrit précédemment. Afin de confirmer l'éventualité que *tiam-1* soit une GEF participant aussi à ce processus, le mutant C11D9.1 (*ok772*) a aussi été traité avec les divers inhibiteurs.



## 2.6 INTERACTION GÉNÉTIQUES AVEC LES GTPASES RHOS ET ARFS

### 2.6.1 TRAITEMENT À L'ARN INTERFÉRANT EN LIQUIDE

Pour cette étude, les différents vecteurs (pL4440-mig-2, pL4440-crp-1, pL4440-rho1, pL4440-ced-10, pL4440-rac-2, pL4440-cdc-42, pL4440-arf1.1, pL4440-arl-1, pL4440-arl-3, et pL4440-arf-6, pL4440-arl-6 et pL4440-gfp) ont été utilisés en combinaison avec les allèles suivants : *wt*, *pak-1(ok448)*, *pix-1(gk416)*, *pix-1(ok982)*, *git-1(ok1848)*. Brièvement, les clones bactériens portant ces vecteurs sont sélectionnés sur LB agar contenant de l'ampicilline 100µg/ml et de la tétracycline 12.5µg/ml et ont poussé durant 16 heures à 37°C. De 10 à 15 colonies sont ré-inoculées dans 2ml de milieu LB liquide contenant de l'ampicilline 100µg/ml et de la tetracycline 12.5µg/ml et ont poussé pendant 16 heures à 37°C. De cette culture, 53µL servent à ré-inoculer 2ml de NGM liquide contenant de l'ampicilline 100µg/ml et ont poussé pendant 3 heures avec agitation à 220rpm, à 37°C. La production d'ARN double brin est induite par l'ajout d'IPTG à une concentration finale de 6mM et la croissance des bactéries est poursuivie pendant 5 heures avec agitation à 220rpm, à 37°C. La culture est ensuite concentrée par centrifugation à 3500rpm pour 3minutes et suspendue dans le tiers du volume initial de NGM liquide. La suspension est distribuée dans une plaque de 96 puits (100µl/puits). De 20 à 30 larves synchronisées au stade L1 sont ajoutées à cette suspension dans un volume maximal de 5µl de M9. Les larves sont traitées avec l'ARN interférant contre les divers GTPases Rhos et GTPases Arfs pour une période de 96 heures à 18°C, avec agitation à 100rpm. Après 96 heures, le nombre total de larves arrêtées (NaLv) est compté et rapporté en fonction du nombre total de larves dans le puits. L'expérience est faite en triplicata et répétée au moins à trois reprises.

## 2.7 INTERACTIONS GÉNÉTIQUES AVEC LES COMPOSANTES DES CORPS DENSES

### 2.7.1 TRAITEMENT À L'ARN INTERFÉRANT SUR SOLIDE

Pour cette étude, les différents vecteurs (pL4440-*ina-1*, pL4440-*pak-1*, pL4440-*git-1*, pL4440-*pix-1* et pL4440-*gfp*) ont été utilisés en combinaison avec les allèles suivants : *ina-1 (gm144)*, *pak-1(ok448)*, *pix-1 (gk416)*, *pix-1 (ok982)*, *pxl-1 (ok1483)* et *pat-6 (st561)*. Brièvement, les clones bactériens portant ces vecteurs sont sélectionnés sur LB agar contenant de l'ampicilline 100µg/ml et de la tétracycline 12.5µg/ml, et ont poussé durant 16 heures à 37°C. De 10 à 15 colonies sont ré-inoculées dans 2ml de milieu LB liquide contenant de l'ampicilline 100µg/ml et de la tétracycline 12.5µg/ml et ont poussé pour 16 heures à 37°C. De cette culture, 53µL servent à ré-inoculer 2ml de NGM liquide contenant de l'ampicilline 100µg/ml et sont poussées pendant 5 heures avec agitation à 220rpm, à 37°C. La production d'ARN double brin est induite par le dépôt de la culture sur une plaque de 24 puits contenant 0.6ml de NGM agar, 100µg/ml d'ampicilline et une concentration finale d'IPTG de 6mM. La croissance des bactéries est poursuivie pendant 16 heures à 37°C. De 10 à 20 larves synchronisées par traitement à l'hypochlorite au stade L1 sont déposées dans les puits dans un volume maximal de 5µL de M9. Les larves sont traitées avec l'ARN interférent pour une période de 72 heures à 18°C. Après 72 heures, les adultes sont flottés par cinq lavages successifs avec 1ml de M9. Les phénotypes Emb et NaLv sont quantifiés tels que décrit précédemment. L'expérience est faite en triplicatas et répétée au moins à trois reprises.

## 2.8. INTERACTION AVEC GLR-1

### 2.8.1 QUANTIFICATION DU PHÉNOTYPE DE RECHERCHE EN ZONE RESTREINTE ET DISPERSION

Afin de quantifier l'altération du comportement des nématodes mutants en recherche de nourriture, les souches *wt* et *pix-1 (gk416)* ont été synchronisées par hypochlorite et leur comportement de recherche de nourriture a été évalué au stade jeune adulte. Pour ce faire, un

adulte est transféré sur une plaque de NGM agar sans nourriture à l'aide d'un capillaire rempli de M9. Le nématode est laissé sur la plaque, libre de se mouvoir sur dix longueurs de corps. Le nématode est alors transféré sur une nouvelle plaque de NGM agar sans nourriture à l'aide d'un capillaire rempli de M9. L'excédent de M9 est absorbé avec un papier filtre. Une période de 3 minutes s'écoule avant de débiter la vidéo-microscopie des mouvements du nématode. Les mouvements sont ensuite enregistrés pour une période de 5 minutes, il s'agit ici du phénotype de zone de recherche restreinte. Une période de 45 minutes s'écoule afin de permettre au nématode de passer du comportement de recherche en zone restreinte au comportement de dispersion. Le comportement du nématode est alors enregistré pour une seconde période de 5 minutes. Les données suivantes seront tirées de l'analyse des films : le nombre de mouvements de recul, le temps de reculs, le nombre de mouvements d'avancement et le temps d'avancement. De plus, le mouvement oscillatoire (de gauche à droite) de la tête en présence de nourriture a été observé sur une période de cinq minutes.

## 2.8.2 ÉTUDES COMPORTEMENTALES DANS LES LABYRINTHES

Les nématodes ont été synchronisés par traitement à l'hypochlorite et incubés pour une durée de 72 heures à 18°C sur le NGM agar, avec OP50 comme source de nourriture. La population synchronisée au stade jeune adulte a ensuite été flottée avec du M9 et lavée des bactéries par 3 centrifugations successives à 3500rpm pour 3 minutes. Les labyrinthes en PDMS, sont préalablement déposés sur un milieu de chimiotaxie (CTX) (10 mM Mops (pH 7.2), 0.25% v/v Tween 20, 15 g/l agar). Ce milieu particulier est utilisé, puisque le chimiotactisme des nématodes est influencé par plusieurs facteurs, dont la présence de certains ions ( $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$ ). À la sortie du labyrinthe, 1µl de  $\text{NaN}_3$  250mM, ainsi que 1µl de Benzaldéhyde 0.1%, sont déposés. Le  $\text{NaN}_3$  agit comme paralysant, alors que le benzaldéhyde est un chémo-attractant. Les nématodes sont déposés à l'entrée du labyrinthe dans un volume minimal de M9. L'excédent de liquide est absorbé et les nématodes sont laissés libres de se mouvoir pour 1 ou 2 heures à température de la pièce. Ensuite, les nématodes sont mis à 4°C pour arrêter tout mouvement. Le nombre de vers au début, au centre et à l'extrémité du labyrinthe est compté et rapporté sur le nombre total de nématodes présents dans le labyrinthe. Cette expérience a été effectuée à trois reprises en triplicata.

### 2.8.3 QUANTIFICATION DE L'EXPRESSION DE GLR-1::GFP

Des nématodes transgéniques, exprimant le récepteur au glutamate GLR-1 en fusion traductionnelle avec la protéine fluorescente GFP, ont été utilisés pour vérifier l'effet d'une mutation de *pix-1* sur l'expression de ce récepteur. Ainsi, les nématodes transgéniques ont été croisés avec les mutants *pix-1 (gk416)*. Les nématodes ont été synchronisés par traitement à l'hypochlorite et incubés pendant 72 heures à 18°C sur le NGM agar, avec OP50 comme source de nourriture. La population synchronisée au stade jeune adulte a ensuite été flottée avec du M9 contenant 0.01% de Triton X100 et directement déposée dans la cupule du cytomètre en flux pour nématodes (COPAS BIOSORT, Union Biometrica). Les réglages du COPAS étaient tels qu'indiqué dans les tables 2-8 et 2-9 avec un TOF (time of flight) minimal de 10, un seuil de 80 et un filtre 418nm.

TABLE 2-8 : RÉGLAGES DE VISUALISATION DU COPAS BIOSORT

<b>TOF</b>	<b>1024</b>
<b>EXT</b>	2048
<b>GREEN</b>	2048
<b>YELLOW</b>	256
<b>RED</b>	1024

TABLE 2-9: RÉGLAGES D'AMPLIFICATION DU SIGNAL DU COPAS BIOSORT

	<b>Gain</b>	<b>Intensity</b>
<b>EXT</b>	80	100
<b>GREEN</b>	200	200
<b>YELLOW</b>	200	200
<b>RED</b>	200	200

La fenêtre de la distribution de l'extinction (EXT) versus le TOF contenant la population de jeunes adultes a été définie pour les valeurs de TOF se situant entre 300 et 500 dans ce contexte. Cette expérience a été répétée au moins à trois reprises. Les nématodes N2 bristol ont servi de contrôle pour établir la valeur de l'auto-fluorescence, alors que les GLR-1::GFP ont été comparés aux nématodes GLR-1::GFP ; *pix-1 (gk416)*.

#### 2.8.4 QUANTIFICATION ET LOCALISATION DE GLR-1::GFP PAR MICROSCOPIE À FLUORESCENCE

Une population de nématodes au stade jeune adulte est flottée avec du M9 et nettoyée des bactéries par trois centrifugations d'une minute à 900g. Les nématodes sont, par la suite, suspendus dans du levamisole (Sigma-Aldrich, Oakville, On) 10mM avant d'être montés sur un coussin d'agar 2% et visualisés à l'aide d'un microscope (Leica DM5500) équipé d'un filtre à épi fluorescence GFP et d'un objectif 63x. Une photo est prise sur une épaisseur de 6µm, à une exposition de 75ms ou 300 ms pour la région de la tête et de la corde ventrale respectivement. L'analyse quantitative de la fluorescence est effectuée avec le logiciel Leica AF6000, via la détermination de ROI (Region of interest). Une ROI correspond au corps cellulaire de l'interneurone AVA (Figure 2-1 A), alors qu'une seconde ROI est utilisée pour soustraire le bruit de fond. Cet interneurone a été choisi en raison de son implication dans la régulation des mouvements de recul et par le fait qu'elle exprime le récepteur au glutamate GLR-1 (Gray, Hill et Bargmann, 2005). Ensuite, au niveau de la région post-synaptique, soit la corde ventrale, une ROI est positionnée antérieurement ou postérieurement à 30µm de la vulve. Une seconde ROI, de même dimension, sert à soustraire le bruit de fond (Figure 2-1 B). La variation du rapport de la fluorescence du corps cellulaire sur la fluorescence au niveau de la corde ventrale permettra de quantifier le niveau d'expression de GLR-1::GFP et de confirmer son accumulation ou sa dispersion dans ces zones.

À partir des mêmes images de nématodes, une ligne (POI : Path of interest) a été tracée dans la ROI de la corde ventrale. Cette ligne recense tous les points de fluorescence qui correspondent à des post-synapses exprimant le récepteur GLR-1::GFP. Il est alors possible de quantifier le nombre de points retrouvés sur une région de 35µm, située à une distance de 30µm antérieure ou postérieure à la vulve (Figure 2-1 B). De plus, le niveau de fluorescence de chaque point est recensé, ce qui permet de quantifier la fluorescence au niveau de chacune de ces post-synapses. Dans cette étude, les nématodes transgéniques GLR-1::GFP ont été comparés aux nématodes GLR-1::GFP; *pix-1* (*gk416*).

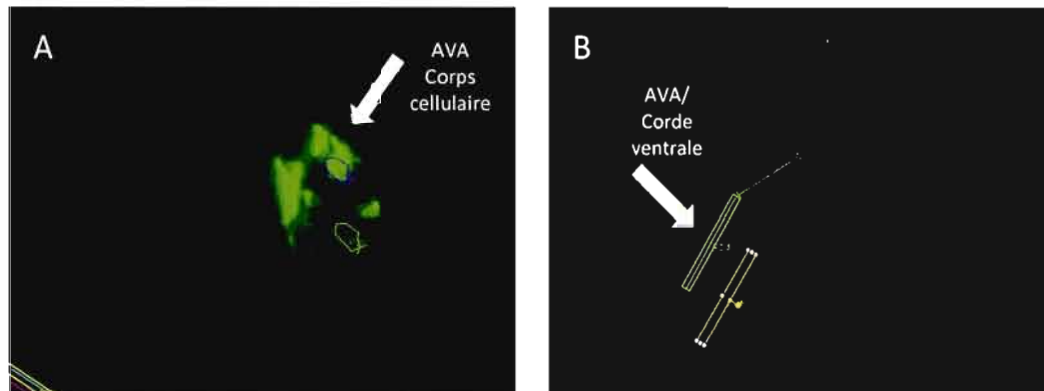


FIGURE 2-1 : METHODE POUR LA QUANTIFICATION ET LA LOCALISATION DE GLR-1::GFP PAR MICROSCOPIE A FLUORESCENCE. La photo représente un nématode transgénique pour GLR-1::GFP, vu en épifluorescence. **A)** Région de la tête d'un nématode et localisation de l'inter-neurone AVA pour positionner les ROIs. **B)** Positionnement des ROIs au niveau de la corde ventrale et des POIs.

#### 2.8.5 COLOCALISATION DE GLR-1::GFP ET PIX-1::MCHERRY

Des mâles transgéniques GLR-1::GFP ont été générés, comme décrit précédemment, et croisés avec des hermaphrodites transgéniques PIX-1::mCherry. Des nématodes doubles transgéniques ont été isolés et visualisés à l'aide d'un microscope (Leica DM5500) équipé d'un filtre à épifluorescence GFP et d'un objectif 63x.

## CHAPITRE 3

### RÉSULTATS : *pix-1/ git-1/ pak-1* ET LEUR FONCTION DÉVELOPEMENTALE

#### 3.1 CARACTÉRISATION ALLÉLIQUE

Afin de pouvoir interpréter les résultats d'interactions génétiques, il est primordial d'évaluer la nature des mutations utilisées. Pour ce faire, une analyse des altérations de la structure du gène, de la fonction (gain, perte, récessivité et dominance) et, de la protéine résultante a été effectuée.

##### 3.1.1 L'allèle de *git-1* (*ok1848*)

En regard de la structure génomique, l'allèle *ok1848* correspond à une mutation par délétion de 887 nucléotides, incluant les exons 10 à 13, se traduisant par une protéine tronquée de 163 acides aminés en son C-terminal. Le domaine de liaison à la paxillin qu'on retrouve dans la région C-terminale de la protéine humaine se compose de trente acides aminés (STEDVILKTEQVTKNIQELLRAAQEFKHDS) (Zhang *et al.*, 2008). Malgré une divergence significative entre les séquences pour cette protéine entre le nématode et les mammifères, une séquence consensus est retrouvée dans la région C-terminale de l'homologue de GIT-1 chez *C. elegans*. Cette séquence correspond aux acides aminés 566 à 599 de la protéine du nématode (voir section 1.4.7). Ayant identifié par séquençage que la protéine provenant de l'allèle *ok1848* a perdu son extrémité C-terminale entre les acides aminés 508 et 671, nous avons confirmé que le domaine d'interaction avec la paxillin n'est pas présent dans la protéine tronquée (Figure 3-1). Les domaines fonctionnels, tels que les



domaines ANK, SHD et GAP restant inchangés dans la forme mutante de la protéine, nous pouvons envisager que l'allèle mutant puisse coder pour une protéine partiellement fonctionnelle.



FIGURE 3-1 : CARACTERISATION MOLECULAIRE DE L'ALLELE *git-1* (*ok1848*). L'allèle *ok1848* consiste en une délétion de 163 acides aminés en C-terminal. Cette délétion résulte en l'élimination du domaine d'interaction avec la Paxillin (PBS). Les domaines catalytiques GAP, ankyrine et le domaine SHD médiant l'interaction avec  $\alpha\beta$ -PIX, Pico et FAK chez les mammifères sont conservés.

### 3.1.2 L'ALLELE DE *pix-1* (*ok982*)

L'allèle de *pix-1* (*ok982*), montre que le produit génique altéré consiste en une délétion de 1002pb couvrant l'exon 8 à 11. Cet allèle coderait pour une protéine ayant maintenu ses domaines en position N-terminale SH3 et RhoGEF (DH: Dbl domaine d'homologie), permettant respectivement l'interaction avec PAK et l'activité GEF envers Rac et Cdc42 (Figure 3-2). Par contre, cette protéine aurait perdu les domaines d'interaction avec POPX-2 (FEM-2), GIT-1, Shank (SHN-1) et Scribble (LET-413). De plus le domaine PH, qui permet le ciblage de PIX-1 aux membranes est absent. L'analyse des domaines fonctionnels de la protéine mutante, indique qu'il s'agirait d'un allèle perte de fonction partielle, donc d'un allèle possiblement hypomorphe. En revanche, la nature de la mutation supprimant la plupart des modules interactions protéine-protéine situés à l'extrémité C - terminale de la protéine et l'absence d'activité ciblée et impliquée dans la régulation et le ciblage de l'activité GEF de PIX-1 pourrait aussi indiquer la possibilité de la présence d'un allèle néomorphe ou hypermorphe.

### 3.1.3 L'ALLÈLE DE *pix-1* (*gk416*)

La caractérisation moléculaire de l'allèle de *pix-1* (*gk416*) suggère qu'il s'agit d'un nul, tel que publié précédemment (Lucanic et Cheng, 2008). En effet, l'allèle mutant contient une délétion de la région 5'UTR (5' untranslated region) incluant les quatre premiers exons, ce qui entraîne un décalage du cadre de lectures et seulement 12 acides aminés de la protéine seraient traduits (Figure 3-2).

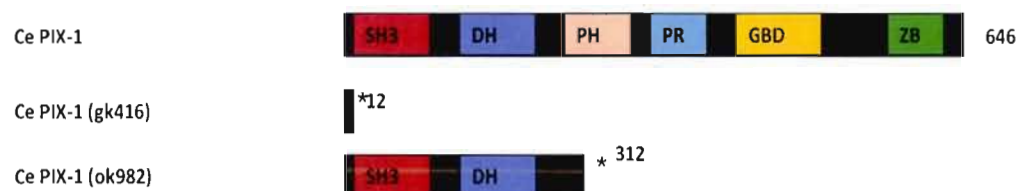


FIGURE 3-2 : CARACTERISATION MOLECULAIRE DES ALLELES *pix-1* (*gk416*) ET (*ok982*). Identification des domaines sur les protéines tronquées résultant de la mutation de *pix-1*. L'allèle *gk416* est nul, avec seulement 12 acides aminés traduits, alors qu'*ok982*, a perdu la majorité de ces domaines d'interactions protéiques.

### 3.1.4 L'ALLÈLE DE *pak-1* (*ok448*)

Tel qu'indiqué précédemment (Gally *et al.*, 2009 ; Lucanic et Cheng, 2008), *pak-1* (*ok448*) est considéré comme un allèle nul. Cet allèle coderait pour une protéine ayant conservé sa capacité à lier PIX-1 et les GTPases activées tout en ayant perdu son domaine kinase (Figure 3-3). Cette mutation est fort intéressante puisqu'elle récapitule le type de mutation retrouvé chez les patients atteints de retard mental lié à l'altération de PAK3 (Allen *et al.*, 1998 ; Donnelly *et al.*, 1996).

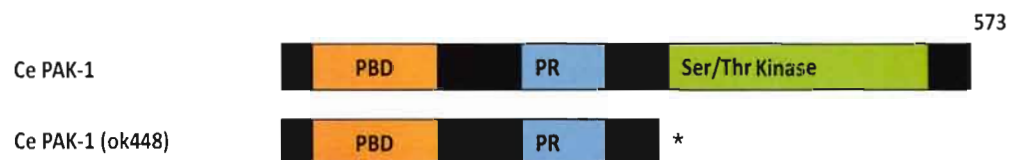


FIGURE 3-3 : CARACTERISATION MOLECULAIRE DE L'ALLELE *pak-1* (*ok448*). L'allèle *ok448* chez le nématode code pour une protéine PAK-1 ne possédant plus son domaine d'activité kinase.

### 3.1.5 ÉVALUATION DE LA DOMINANCE DES ALLÈLES DE *pix-1*, *git-1* et *pak-1*

Les mutations de *pix-1*, *git-1* et *pak-1* résultent en un phénotype de larves non allongées (NaLv), de 15%, 9% et 12% respectivement (Table 3-1). Lorsqu'un hermaphrodite mutant homozygote est croisé avec un mâle de génotype sauvage, il génère une progéniture hétérozygote. La quantification du phénotype NaLv de la progéniture hétérozygote, a permis de mettre en évidence que les allèles *pix-1* (*gk416*), *pix-1* (*ok982*) et *git-1* (*ok1848*) sont semi-dominants pour ce phénotype, puisque la pénétrance du phénotype NaLv est non nulle (ie : 7, 2 et 9% respectivement) dans les populations hétérozygotes (Table 3-1). Concernant l'allèle de *pak-1* (*ok448*), ce dernier serait dominant ou récessif avec un effet maternel, puisque le phénotype de la progéniture hétérozygote est indiscernable du phénotype du mutant homozygote, qui sont respectivement de 13 et 12% (Table 3-1). Afin d'identifier s'il s'agit d'une dominance stricte ou d'un effet maternel la quantification du phénotype a été répétée en considérant la progéniture provenant d'un hermaphrodite hétérozygote. Dans ce dernier cas, on doit retrouver dans la progéniture 50% d'hétérozygote et 25% d'homozygote sauvage puis, 25% d'homozygote mutant, si l'allèle est dominant on doit alors s'attendre à retrouver environ 9% de NaLv dans la population totale. Ce n'est pas le cas, puisque dans cette condition, on retrouve 1% de NaLv. Ceci est une indication que l'allèle de *pak-1* (*ok448*) est récessif avec un effet maternel.

TABLE 3-1 : CARACTÉRISATION DE LA DOMINANCE ALLÉLIQUE DE *pix-1*, *git-1* et *pak-1*

Génotype Maternel	Génotype progéniture	NaLv%	n
<i>pix-1 (gk416) -/-</i>	<i>pix-1 (gk416) -/-</i>	15	367
<i>pix-1 (gk416) -/-</i>	<i>pix-1 (gk416) -/+</i>	7	297
<i>pix-1 (ok982) -/-</i>	<i>pix-1 (ok982) -/-</i>	15	390
<i>pix-1 (ok982) -/-</i>	<i>pix-1 (ok982) -/+</i>	2	264
<i>git-1 (ok1848) -/-</i>	<i>git-1 (ok1848) -/-</i>	9	496
<i>git-1 (ok1848) -/-</i>	<i>git-1 (ok1848) -/+</i>	2	377
<i>pak-1 (ok448) -/-</i>	<i>pak-1 (ok448) -/-</i>	12	434
<i>pak-1 (ok448) -/-</i>	<i>pak-1 (ok448) -/+</i>	13	518
<i>pak-1 (ok448) -/+</i>		1	189

### 3.2 CARACTÉRISATION PHÉNOTYPIQUE DE *PIX-1*, *GIT-1* ET *PAK-1*


Afin de résoudre la fonction du complexe GIT/PIX/PAK chez *C. elegans*, une caractérisation phénotypique exhaustive a été effectuée préalablement à l'analyse fonctionnelle au niveau moléculaire.

#### 3.2.1 *pix-1*, *git-1* et *pak-1* MONTRENT UN DÉFAUT D'ÉLONGATION ET UNE LÉTALITÉ EMBRYONNAIRE

Les allèles de *pix-1*, *git-1* et *pak-1*, présentent un phénotype de létalité embryonnaire (Emb). Cette létalité embryonnaire est très faible et varie entre 1 et 6% à une température de 18°C (Table 3-2). La létalité embryonnaire est légèrement augmentée à 25.5°C, passant à 2 à 11% (Table 3-2). Des larves qui éclosent, une certaine proportion est arrêtée au stade L1. Pour les différents allèles ce phénotype de larves arrêtées a été quantifié et est de 0% pour les nématodes *wt*, 7% pour *pix-1 (ok982)*, 6% pour *pix-1 (gk416)*, 2% pour *git-1 (ok1848)* et 12% pour *pak-1 (ok448)* à 18°C (Table 3-2). Le phénotype NaLv, tout comme le phénotype Emb est aussi significativement aggravé à 25.5°C et est de 0% pour les nématodes *wt*, 15% pour *pix-1 (ok982)*, 10% pour *pix-1 (gk416)*, 4% pour *git-1 (ok1848)*. L'allèle *pak-1 (ok448)* n'est pas affecté par la hausse de température et présente un phénotype NaLv constant de

12% (Table 3-2). La pénétrance des phénotypes Emb et NaLv est faible mais significative par rapport aux souches sauvages sur toutes les expériences effectuées. De plus, les allèles de *pix-1* et *git-1* semblent sensibles à la température, alors que *pak-1* (*ok448*) ne l'est pas. Finalement, le traitement des nématodes *wt* avec des ARNi contre *pix-1*, *git-1* et *pak-1*, induit un phénotype NaLv morphologiquement identique à celui observé chez les mutants, moins pénétrants, ce qui est probablement dû à l'efficacité de ces ARNi. Lorsque les mutants *git-1* sont traités avec les ARNi contre *git-1*, le phénotype de NaLv est augmenté à 4% (Table 3-2), indiquant probablement la nature hypomorphe. Considérant la nature des allèles de *pix-1* (*gk416*) et *pak-1* (*ok448*), nous n'attendons pas d'augmentation du phénotype suite au traitement avec leur ARNi respectifs.

TABLE 3-2 : QUANTIFICATION DE LA LÉTALITÉ EMBRYONNAIRE ET DES LARVES NON-ALLONGÉES

Génotype	18°C			25,5°C		
	Emb %	NaLv %	n	Emb %	NaLv %	n
<i>wt</i>	0	0	709	0	0	771
<i>pix-1</i> ( <i>ok982</i> ) <i>-/-</i>	6	7	1140	11	15	679
<i>pix-1</i> ( <i>gk416</i> ) <i>-/-</i>	1	6	713	3	10	492
<i>git-1</i> ( <i>ok1848</i> ) <i>-/-</i>	1	2	731	1	4	735
<i>pak-1</i> ( <i>ok448</i> ) <i>-/-</i>	1	12	2502	2	12	133
RNAi <i>pix-1</i> ( <i>wt</i> )	0	1	629			
RNAi <i>git-1</i> ( <i>wt</i> )	0	2	1785			
RNAi <i>pak-1</i> ( <i>wt</i> )	1	2	1731			
RNAi <i>git-1</i> ; <i>git-1</i> ( <i>ok1448</i> )	1	4	1510			

Ces phénotypes Emb et NaLv signifient une implication potentielle de *pix-1*, *git-1* et *pak-1* dans les processus d'élongation embryonnaire précoce et/ou tardive. Ces larves ont une taille correspondant à un arrêt d'élongation entre le stade plié 2 fois et le stade plié 3 fois lorsque comparé au larve *wt* du stade L1(Figure 3-4). Ce rôle dans l'élongation précoce et/ou tardive est très évident dans le cas de *pak-1* qui en plus de présenter le phénotype NaLv et Emb, présentent aussi des larves NaLv ayant une taille correspondant à un arrêt d'élongation au stade plié 1.2-1.5 fois. Ce phénotype est une indication claire d'un trouble d'élongation durant le développement embryonnaire.



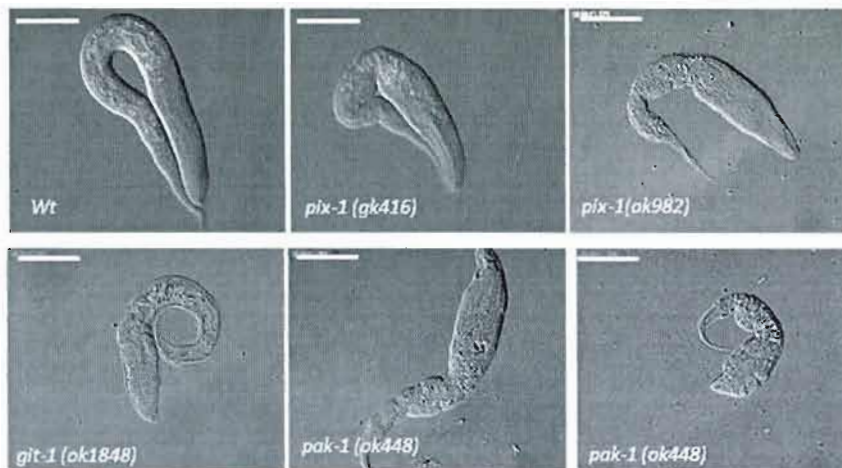


FIGURE 3-4 : L'ÉLONGATION DES LARVES ARRÊTÉES *pix-1*, *git-1* ET *pak-1* EST INCOMPLETE. De gauche à droite, de haut en bas. Sont montrées dans l'ordre, une larve L1 sauvage, une *pix-1* (*gk416*), *pix-1* (*ok982*), *git-1* (*ok1848*) et une *pak-1* (*ok448*).

### 3.2.2 *pix-1*, *git-1* ET *pak-1* MONTRENT UN DÉFAUT DE CONTRACTION DU PHARYNX

Les nématodes mutants pour *pix-1* (*gk416*), *pix-1* (*ok982*), *git-1* (*ok1848*) et *pak-1* (*ok448*) qui exhibent un trouble d'élongation, sont complètement paralysés et présentent un trouble de contraction du pharynx. Les larves non-allongées de tous ces mutants ont une fréquence de contraction du pharynx très significativement réduite lorsque comparées à des larves L1 sauvages, mais aussi très significativement réduite par rapport aux larves qui se sont développées normalement (Figure 3-5). Une fréquence réduite de contraction peut traduire un défaut neuromusculaire, de neurotransmission ou un défaut musculaire. Tout de même, ces larves ont un pharynx bien développés (Figures 3-4), ce qui indique qu'il ne s'agit fort probablement pas d'un problème majeur de morphogenèse de l'appareil digestif.

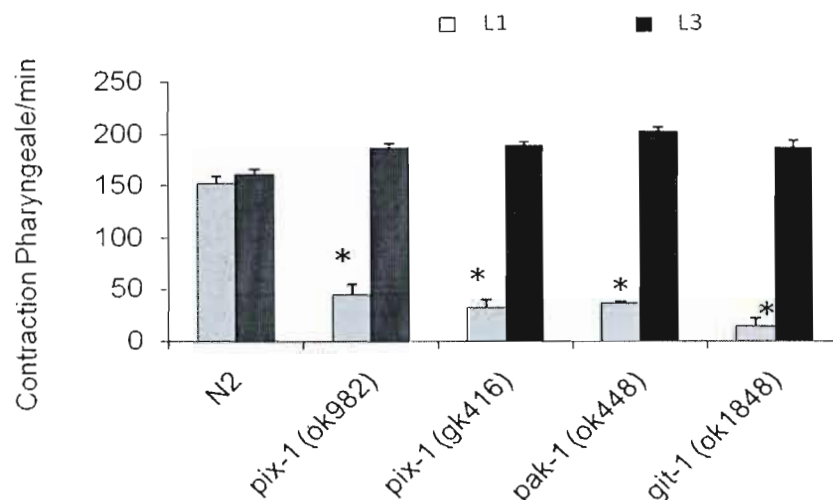


FIGURE 3-5: *pix-1*, *git-1* ET *pak-1* PRESENTENT UN DEFAUT DE CONTRACTION DU PHARYNX. Le nombre de contraction du pharynx a été mesuré sur une période de 20 secondes et rapporté par minutes. Les larves arrêtées de *pix-1*, *git-1* et *pak-1* présentent une réduction du taux de contraction par rapport aux larves L1 *wt* et par rapport aux larves non-arrêtées \* test de student  $p < 0.05$ .

### 3.3 CARACTÉRISATION FONCTIONNELLE DE *pix-1*, *git-1* ET *pak-1*

Chez le nématode on retrouve trois CLMr (chaînes légère de myosine régulatrice) dont *mlc-1*, *mlc-2* et *mlc-4*. MLC-1/2 ont été montrées pour leur fonctions de contrôle des contractions pharyngales, alors que MLC-4, telle que mentionné précédemment est impliquée dans l'élongation embryonnaire. Afin d'évaluer le rôle de *pix-1*, *git-1* et *pak-1* durant l'élongation et les contractions pharyngales, nous avons tenté de les positionner par rapport à la machinerie de régulation de l'activité des CLMr par une approche génétique.

#### 3.3.1 PIX-1, GIT-1 ET PAK-1 CONTRÔLENT LA CONTRACTION DU PHARYNX

Le pharynx est un organe neuro-musculaire et l'altération de son taux de contraction peut-être causée par un problème de neuro-transmission, mais encore par une altération de la machinerie de contraction musculaire. En effet, des mutants pertes de fonction de deux gènes



codant pour des homologues CLMr, soit *mlc-1* et *mlc-2* (Rushforth, White et Anderson, 1998), présentent aussi un défaut de contraction du pharynx et un arrêt de croissance larvaire.

Afin de vérifier, si la réduction du taux de contraction du pharynx observée chez les mutants *pix-1*, *git-1* et *pak-1* pourrait aussi être dû à un déséquilibre de la régulation de l'activité des CLMr (*mlc-1/2*) exprimées au niveau du pharynx, le taux de contraction du pharynx a été évalué en présence et en absence de Blebbistatine et de ML7, respectivement un inhibiteur de l'activité ATPasique de la myosine II musculaire et non-musculaire et un inhibiteur de MLCK.

Les L1 *wt* traitées avec Blebbistatine 10 $\mu$ M, présentent un taux de contraction du pharynx réduit par rapport aux conditions contrôlées, alors que les L1 *wt* traités avec ML7 2 $\mu$ M, ne présentent pas d'altération du taux de contraction du pharynx (Figure 3-6). En aucun cas le taux de contraction du pharynx des L3 n'est affecté. Le traitement des L1 arrêtées mutantes pour *pix-1* et *pak-1* présentent une réduction significativement renforcée de la contraction du pharynx lorsque comparées au mutants non traités (Figure 3-6). De façon intéressante le taux de contraction du pharynx des larves L3 de ces mutants n'est pas affecté par le traitement lorsque comparé aux nématodes sauvages (données non représentées).

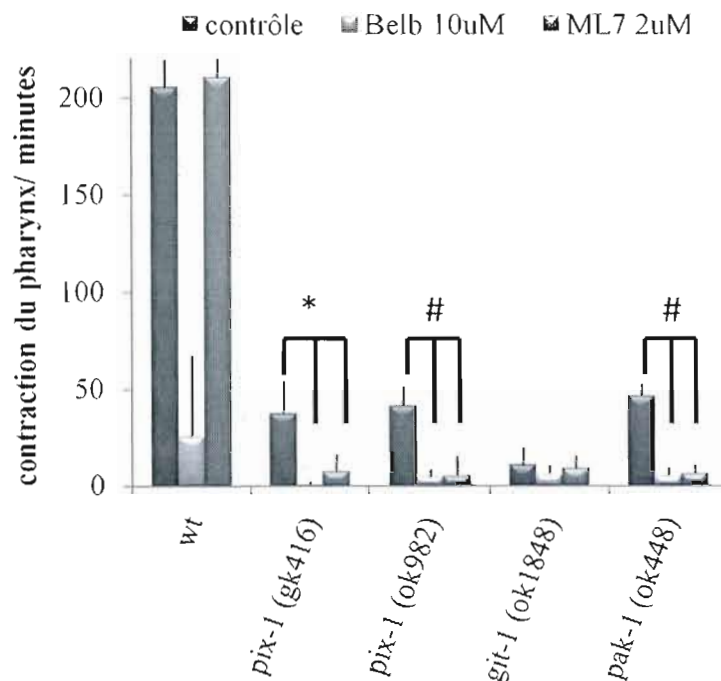


FIGURE 3-6 : *pix-1*, *git-1*, *pak-1* ONT UN IMPACT SUR LA CONTRACTION DU PHARYNX. Les larves arrêtées qui ont une réduction du taux de contractions du pharynx, lorsque traitées avec la Blebbistatine 10 $\mu$ M ou le ML7 2 $\mu$ M, présentent une aggravation significative de ce phénotype à l'exception des larves *git-1 (ok1848)*. Test de Student \* $p < 0.01$  # $p < 0.001$ .

Ces données ne permettent pas de conclure sur le positionnement exacte de *pix-1*, *git-1* et *pak-1* dans le processus de contraction du pharynx. Les résultats indiquent tout de même que ces gènes pourraient fonctionner autant en amont qu'en parallèle des CLMRs. Ils pourraient aussi être impliqué dans un processus tout à fait différent des contractions pharyngales, mais contribuant à l'aggravation du troubles de contractions.

### 3.3.2 PATRON D'EXPRESSION DE PIX-1, GIT-1 ET PAK-1

L'observation des nématodes transgéniques PIX-1::mCherry, générés pour cette étude a permis d'identifier superficiellement le profil d'expression de PIX-1. Dans l'embryon, PIX-1 est exprimé à partir du stade haricot, de manière diffuse et ubiquitaire (Figure 3-7A). Suite à l'initiation de l'élongation, au stade plié 1.2x -1.5x, une accumulation de PIX-1::mCherry est

observée. PIX-1 semble se concentrer, à ce stade, aux jonctions cellulaires hypodermiques (Figure 3-7B). Cette localisation devra être confirmée par un co-marquage spécifique. Finalement, PAK-1 a été montré pour être exprimé aux jonctions cellulaires hypodermiques de l'embryon durant l'élongation (Chen *et al.*, 1996) et les données de SAGE indiquent que GIT-1 est aussi exprimé dans les cellules de l'hypoderme et lors du développement embryonnaire. Ces profils d'expression suggèrent que PIX-1, GIT-1 et PAK-1 peuvent participer à la morphogenèse de l'embryon et plus particulièrement à l'étape d'élongation.

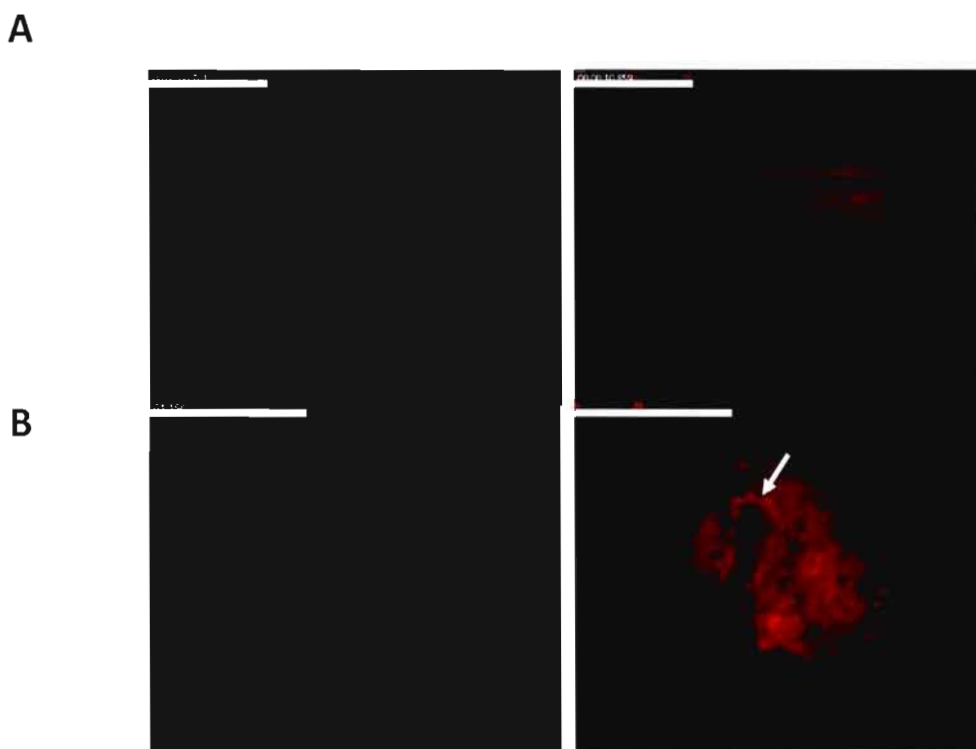


FIGURE 3-6: PROFIL D'EXPRESSION DE PIX-1::MCHERRY A) PIX-1 est exprimé à partir du stade haricot, de manière ubiquitaire et en périphérie des membranes cellulaires B) et son expression semblent se concentrer aux jonctions cellulaires hypodermiques au stade plié 1.2-1.5x.

Chez le nématode adulte, il a été montré que le transgénique PIX-1::mCherry en fusion traductionnelle, généré pour cette étude exprime PIX-1 dans de nombreuses cellules incluant celles du pharynx. PIX-1::mCherry est largement accumulé aux membranes basolatérales des cellules myo-épithéliales du pharynx (Figure 3-7 B ). La distribution en amas de points, de

PIX-1, pourrait représenter les points d'adhésion des cellules du pharynx à la matrice extracellulaire (membrane basale) ou a d'autres types cellulaires tels que les neurones pharyngaux. GIT-1::GFP (Figure 3-7C), ainsi que PAK-1 ::GFP (Iino et Yamamoto, 1998) sont aussi exprimés dans le pharynx.

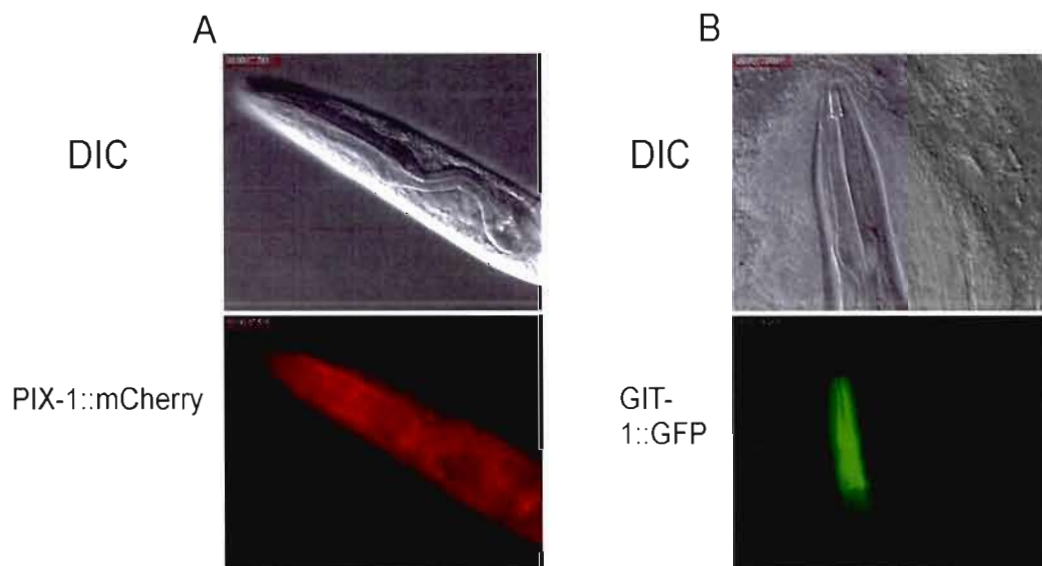


FIGURE 3-7 : EXPRESSION ET LOCALISATION DE PIX-1::MCHERRY ET GIT-1::GFP A) PIX-1 ::mCherry est exprimé au niveau du pharynx, dans les cellules basolatérale du myoépithélium. C) GIT-1::GFP est aussi exprimé au niveau du pharynx.

### 3.3.3 *pix-1* ET *pak-1* INTERAGISSENT AVEC LES COMPOSANTES DE LA VOIE *mel-11/let-502*

L'élongation de l'embryon nécessite l'activité de la CLMr MLC-4 (Gally *et al.*, 2009) et l'activité de MLC-4 est régulée par la voie MEL-11/LET-502. Afin de mettre en évidence le rôle de PIX-1, GIT-1 et PAK-1 dans la régulation de l'activité des CLMr, durant l'élongation, une approche génétique a été utilisée. Nous avons testé si *pix-1* (*gk416*) et *pak-1* (*ok448*) contrôlent le processus d'élongation en parallèle ou au sein de la voie MEL-11/LET-502. Considérant la nature des allèles de *git-1* (*ok1848*) et *pix-1* (*ok982*), très probablement hypomorphes, l'épistasie de ces dernières par rapport à *mel-11* et *let-502* (allèle nul) n'a pas été évaluée, puisque qu'elle ne permettrait pas de conclure sur le positionnement de ces gènes

par rapport à la voie MEL-11/LET-502. Par conséquent, les allèles nuls *pix-1* (*gk416*) et *pak-1* (*ok448*) seront évalués à savoir s'ils interagissent génétiquement avec *mel-11* (*it26*) et *let-502* (*sb118ts*), des mutants sensibles à la température. Il y a rupture de 98% des nématodes *mel-11* (*it26*) à 18 ° C au début de l'élongation comme précédemment décrit (Table 3-3) (Piekný, Wissmann et Mains, 2000). Cette létalité embryonnaire a été réduite de 98 à 42% chez les nématodes *mel-11* (*it26*); *pix-1* (*gk416*) (Table 3-3), suggérant que *pix-1* et *mel-11* ont une fonction antagoniste lors d'événements d'allongement précoce. En outre, une petite fraction des nématodes *mel-11* (*it26*); *pix-1* (*gk416*) ayant éclos présentent le phénotype de larves arrêtées au stade L1, caractéristique de *pix-1* et ce, avec une pénétrance similaire à celle observée pour les simples mutants *pix-1* (*gk416*) (Table 3-3). Il s'agit d'une indication que *mel-11* contrôlerait l'élongation précoce en amont de *pix-1* et qu'il ne serait pas impliqué au cours de l'élongation tardive ou alors, de façon redondante avec une autre protéine.

En cohérence avec l'implication de *pak-1* dans l'élongation précoce (Gally *et al.*, 2009), le double mutant de *mel-11* (*it26*); *pak-1* (*ok448*), rupture, comme *mel-11* (*it26*) et quantitativement le phénotype du double mutant est le même que *mel-11* (*it26*) (Table 3-3), indiquant que *pak-1* pourrait fonctionner en amont ou en parallèle de *mel-11*. Ensuite, l'évaluation a été poursuivie pour déterminer si *pix-1* (*gk416*) et *pak-1* (*ok448*) interagissent avec *let-502* (*sb118ts*) à 25,5 ° C (température non permissive). En cohérence avec les études précédentes, 99% des nématodes *let-502* (*sb118ts*) cultivés à 25,5 ° C présentent de graves défauts d'élongation indiqués par un phénotype caractéristique de larves arrêtées (Table 3-3, Figure 3-9). En outre, 8% des embryons sont arrêtés à l'étape d'élongation entre le stade virgules et plié 1,5 fois (Table 3-3). Cette létalité embryonnaire est fortement augmentée jusqu'à 89% chez le double mutant *let-502* (*sb118ts*); *pix-1* (*gk416*) à 25,5 ° C (Table 3-3, Figure 3-9). En outre, 100% des larves écloses présentent aussi le phénotype de larves arrêtées typique à *let-502* (Table 3-3 Figure 3-9). Ceci suggère que *pix-1* permettrait de contrôler l'allongement précoce en parallèle ou en aval de *let-502*. Invariablement, *pak-1* (*ok448*), *let-502* (*sb118ts*) comme indiqué dans une étude précédente (Gally *et al.*, 2009), fait obstacle à l'allongement de l'embryon au stade plié 1,2 fois et par conséquent 100% du développement de l'embryon est perturbé (Table 3-3). Ces résultats confirment ce qui a été

rapporté dans la littérature, c'est à dire que *pak-1* (*ok448*) fonctionnerait en parallèle de *let-502* (*sb118ts*) pour promouvoir la phosphorylation de MLC-4.

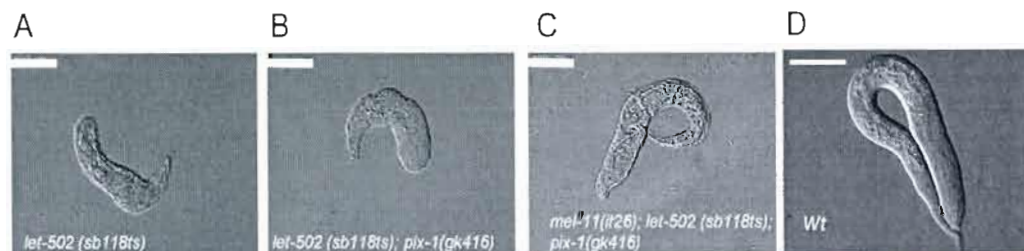


FIGURE 3-9: CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES DES LARVES ARRETEES. Les larves arrêtées, montées sur un coussin d'agar, ont été observées sous illumination DIC avec un objectifs 63x et un oculaire 10x.

Afin d'évaluer si *pak-1* fonctionnerait en parallèle de la voie LET-502/MEL-11, un triple mutant *mel-11* (*it26*); *let-502* (*sb118ts*); *pak-1* (*ok448*) a été généré. Le triple mutant de *pak-1* (*ok448*); *mel-11* (*it26*), *let-502* (*sb118ts*) a affiché 100% d'Emb, ce qui correspond en réalité à des embryons arrêtés au stade plié 1,2 fois (Table 3-3). Tel que publié récemment (Gally *et al.*, 2009), il est indiqué que *pak-1* fonctionne définitivement en parallèle à la voie MEL-11/LET-502 au cours de l'élongation précoce.


Afin d'évaluer si *pix-1* fonctionnerait en parallèle de la voie LET-502 / MEL-11, un triple mutant a été généré soit : *mel-11* (*it26*), *let-502* (*sb118ts*); *pix-1* (*gk416*). À 18 ° C, ces animaux expriment un phénotype Emb réduit par rapport à *mel-11* (*it26*); *let-502* (*sb118ts*) (Table 3-3). Ceci est cohérent avec la suppression du phénotype Emb de *mel-11* (*it26*) déjà observé chez le mutant *mel-11* (*it26*); *pix-1* (*gk416*) (Table 3-3). Ces résultats sont également en accord avec le fait qu'à cette température, *let-502* exprime une protéine fonctionnelle.

Entre le stade coma et plié 1,5 fois, à 25,5 ° C, 71% des mutants *mel-11* (*it26*);*let-502* (*sb118ts*); *pix-1* (*gk416*) s'arrêtent, ce qui se traduit par une létalité embryonnaire (Table 3-3). Il s'agit d'une aggravation très importante des défauts d'élongation associés à *let-502* par rapport au mutant *mel-11* (*it26*), *let-502* (*sb118ts*) (Table 3-3). À cette température, 55% des



larves *mel-11 (it26)*; *let-502 (sb118ts)*; *pix-1 (gk416)* qui éclosent présentent le phénotype de larves arrêtées caractéristique de *pix-1 (gk416)* (Table 3-3).

TABLE 3-3 : INTERACTION GÉNÉTIQUE AVEC *mel-11* ET *let-502*

Génotype	18°C			25,5°C		
	Emb %	NaLv %	n	Emb %	NaLv %	n
<i>wt</i>	0	0	531	0	0	323
<i>pix-1 (gk416)</i>	1	5*	432	3	9*	479
<i>pak-1(ok448)</i>	1	12*	1731	2	12*	133
<i>mel-11 (it26)</i>	98	0	508	100	0	65
<i>let-502 (sb118ts)</i>	0	0	645	8	99 <sup>\$</sup>	353
<i>mel-11 (it26); let-502 (sb118ts)</i>	96	0	905	24	0	487
<i>mel-11 (it26); pix-1 (gk416)</i>	42	3*	152			
<i>let-502 (sb118ts); pix-1 (gk416)</i>	18	3*	764			
<i>mel-11 (it26); let-502; pix-1 (gk416)</i>	36	3*	395	71	55*	583
<i>pak-1 (ok448); mel-11 (it26)</i>	98	0	763	100	0	931
<i>pak-1 (ok448); let502 (sb118ts)</i>	1	9*	2417	100	0	2003
<i>mel-11(it26); let-502ts; pak-1(ok448)</i>	100	0	1066	100	0	891

\*Larves de type *pix-1*, \$Larves de type *let-502*, \$\$Larves de types *let-502* mortes

### 3.3.4 *pix-1*, *git-1* ET *pak-1* CONTRÔLENT LA FONCTION DE LA MYOSINE II DURANT L'ÉLONGATION TARDIVE

Afin de mettre en évidence la fonction de régulateur de la phosphorylation des CLMr de *pix-1*, *pak-1* et *git-1* au cours de l'élongation tardive et aussi afin de confirmer l'implication de la myosine II à ce stade, la pénétrance du phénotype de NaLv a été mesurée chez les animaux soumis à un traitement à la Blebbistatine, la Calyculin A ou ML7. Il a été précédemment démontré que ces inhibiteurs entravent spécifiquement l'activité ATPasique de la myosine II, l'activité sérine thréonine phosphatase de la famille PP1 et PP2A dont MLCP, et l'activité kinase de MLCK, à la fois chez les mammifères et les nématodes (Ishihara *et al.*, 1989 ; Kovacs *et al.*, 2004 ; Resjo *et al.*, 1999 ; Schlaitz *et al.*, 2007 ; Yuce, Piekny et Glotzer, 2005). En outre, les inhibiteurs, à l'inverse des allèles *mel-11* et *let-502* présentant des



phénotypes très pénétrants soit de létalité embryonnaire ou de stérilité, permettent une légère réduction de l'activité des machineries de phosphorylation des CLMr de manière à ne pas bloquer l'élongation à un stade précoce. Suivant cette logique, il devient possible de mettre en évidence la fonction de la myosine II, de *mel-11*, *pix-1*, *pak-1* et *git-1* aux étapes tardives d'élongation, qui reste à ce jour peu caractérisées.

La pénétrance du phénotype de NaLv des nématodes *pix-1 (gk416)*, *pix-1 (ok982)*, *git-1 (ok1848)* et *pak-1 (ok448)* soumis à un traitement à la blebbistatine a été mesurée. Le traitement des nématodes sauvages avec la blebbistatine induit un phénotype de 2% de NaLv (Table 3-4). Ce résultat peut être indicatif de la nature du trouble d'élongation tardive, qui découlerait en partie, de l'absence de contraction de l'ACAM. Lorsque les mutants *pix-1 (gk416)*, *pix-1 (ok982)*, *git-1 (ok1848)* et *pak-1 (ok448)* sont traités à la blebbistatin, ils présentent tous une aggravation synergique du phénotype de NaLv, qui augmente respectivement de 9 à 22%, 10 à 27%, 5 à 9% et enfin de 14% à 41% (Table 3-4).

TABLE 3-4 : TRAITEMENT A LA BLEBBISTATINE ET INTERACTIONS GENETIQUES DE *pix-1*, *git-1* ET *pak-1*, AVEC LA MYOSINE II.

Génotype	Traitement	% NaLv	Nombre de vers
<i>wt</i>	DMSO	0	875
<i>wt</i>	Blebb 100µM	2 *	456
<i>pix-1 (gk416)</i>	DMSO	9	603
<i>pix-1 (gk416)</i>	Blebb 100µM	22 #	236
<i>pix-1 (ok982)</i>	DMSO	10	345
<i>pix-1 (ok982)</i>	Blebb 100µM	27 **	297
<i>git-1 (ok1848)</i>	DMSO	5	513
<i>git-1 (ok1848)</i>	Blebb 100µM	9 **	472
<i>pak-1 (ok448)</i>	DMSO	14	382
<i>pak-1 (ok448)</i>	Blebb 100µM	41 **	138

\*p<0.05, \*\*p<0.01, #p<0.001

Ensuite la pénétrance du phénotype NaLv des nématodes *pix-1 (gk416)*, *pix-1 (ok982)* et *git-1 (ok1848)* soumis à un traitement à la Calyculin A a été calculée. La relation fonctionnelle entre PAK-1 et MEL-11, étant élucidée (Gally *et al.*, 2009), l'allèle de *pak-1 (ok448)* n'a pas été testé. Le traitement des nématodes sauvages avec la Calyculin A induit un phénotype de

30% de NaLv (Table 3-5). Ce résultat indique que le trouble d'élongation tardive découle partiellement de l'absence de contraction de l'ACAM. Lorsque les mutants *pix-1 (gk416)*, *pix-1 (ok982)* et *git-1 (ok1848)* sont traités à la Calyculin A, cet effet de la Calyculin A est très significativement réduit à 13, 19 et 20% respectivement pour la mutation perte de fonction ou réduction de fonction de *pix-1 (gk416)* et *(ok982)* et *git-1 (ok1848)* (Table 3-5). Tout d'abord, ces résultats confirment la relation d'antagonisme que partagent *mel-11* et *pix-1*, qui a été précédemment mise en évidence (Table 3.3, section 3.3.3). Ces résultats montrent aussi un antagonisme entre *mel-11* et *git-1*.

TABLE 3-5 : TRAITEMENT À LA CALYCULIN A ET MISE EN ÉVIDENCE D'INTERACTIONS GÉNÉTIQUES ENTRE *pix-1* et *git-1* ET *mel-11* LORS DE L'ÉLONGATION TARDIVE.

Génotype	Traitement	% NaLv	Nombre de vers
<i>wt</i>	DMSO	0	1297
<i>wt</i>	Calyculin 10nM	30	463
<i>pix-1 (gk416)</i>	DMSO	7	290
<i>pix-1 (gk416)</i>	Calyculin 10nM	13 *	320
<i>pix-1 (ok982)</i>	DMSO	11	683
<i>pix-1 (ok982)</i>	Calyculin 10nM	19 *	310
<i>git-1 (ok1848)</i>	DMSO	6	122
<i>git-1 (ok1848)</i>	Calyculin 10nM	20 *	107

\* $p < 0.05$ , par rapport à *wt* Cal10nM

Il a été mis en évidence que LET-502, MRCK-1 et PAK-1 régulent en parallèle l'élongation chez le nématode (Gally *et al.*, 2009). Les résultats de cette étude conduisent à l'hypothèse de la présence d'une autre Kinase ou d'une autre voie/protéine conduisant à la phosphorylation des CLMr. La présence d'une MLCK régulant la phosphorylation de MLC-4 a déjà été proposée (Piekny et Mains, 2003), mais à ce jour, aucune MLCK n'a été identifiée comme étant impliquée dans le contrôle de l'élongation. Afin de confirmer qu'une MLCK puisse aussi participer à la régulation de la machinerie de phosphorylation des CLMr, conduisant à la contraction de l'ACAM, un inhibiteur de MLCK, ML-7 a été utilisé. L'inhibiteur ML-7 n'induit pas de létalité embryonnaire ni d'arrêt larvaire chez les nématodes *wt* à une concentration de 2 $\mu$ M. Ce résultat serait consistant avec le haut niveau de voies redondantes et parallèles déjà montrées pour réguler ce processus. Lorsque les mutants *pix-1 (gk416)*, *pix-*

*l* (*ok982*), *git-1* (*ok1848*) et *pak-1* (*ok448*) sont traités avec ML7 2 $\mu$ M, ils présentent tous une aggravation synergique significative du phénotype NaLv, passant respectivement de 7 à 19%, 11 à 17%, 4 à 17%, 11 à 18% (Table 3-6).

TABLE 3-6 : TRAITEMENT ML-7 ET MISE EN ÉVIDENCE D'INTERACTIONS GÉNÉTIQUES ENTRE *pix-1*, *git-1* et *pak-1* ET UNE MLCK

Génotype	Traitement	% NaLv	Nombre de vers
<i>wt</i>	Contrôle	0	1453
<i>wt</i>	ML7 2 $\mu$ M	0	1160
<i>pix-1</i> ( <i>gk416</i> )	Contrôle	7	681
<i>pix-1</i> ( <i>gk416</i> )	ML7 2 $\mu$ M	19 **	690
<i>pix-1</i> ( <i>ok982</i> )	Contrôle	11	652
<i>pix-1</i> ( <i>ok982</i> )	ML7 2 $\mu$ M	17 **	1124
<i>git-1</i> ( <i>ok1848</i> )	Contrôle	4	624
<i>git-1</i> ( <i>ok1848</i> )	ML7 2 $\mu$ M	17 *	518
<i>pak-1</i> ( <i>ok448</i> )	Contrôle	11	395
<i>pak-1</i> ( <i>ok448</i> )	ML7 2 $\mu$ M	18*	335

\*p<0.001, \*\*p<0.0001

### 3.3.5 *pix-1*, *pak-1* ET *git-1*, INDUISENT UNE RÉDUCTION DE LA VITESSE D'ÉLONGATION

Afin de mieux caractériser le défaut d'élongation associé aux allèles *pix-1* (*gk416*), *pak-1* (*ok448*) et *git-1* (*ok982*) puis, de confirmer leur implication aux étapes d'élongation précoce et tardive, la vitesse d'élongation entre les stades de développement a été quantifiée en utilisant la microscopie à 4 dimensions. Les allèles *pix-1*(*gk416*), *pak-1*(*ok448*) et *git-1* (*ok1848*) présentent une réduction significative de leur vitesse d'élongation entre le stade coma et le stade plié 2x (Figure 3-10 A-B). Ce retard d'élongation se poursuit au cours de la phase d'élongation tardive entre le stade plié 2x et 3x (Figure 3-10C). La réduction de la vitesse de développement semble, dans ce cas, plus soutenue qu'aux étapes précoces de développement. Ceci confirme l'implication de *pix-1*(*gk416*), *pak-1*(*ok448*) et *git-1* (*ok1848*) dans le contrôle de l'élongation précoce et tardive. En concordance avec le rôle crucial joué par *let-502* au cours de l'élongation précoce, les mutants *let-502* (*sb118ts*) montrent non seulement une réduction significative de la vitesse d'élongation au cours de l'élongation

précoce (Figure 3-10 A) entre le stade coma et plié 1.5x mais, un arrêt complet de l'élongation. Les embryons *let-502 (sb118ts)* qui échappent à l'arrêt au stade plié 1.2-1.5 fois présentent un retard au cours de l'élongation plus tardive entre le stade plié 1.5 et 2x et ce sans jamais atteindre le stade plié 3x (Figure 3-10 B-C). La participation de *pak-1* dans l'allongement précoce est conforme à son rôle dans l'élongation précoce montré par une autre équipe (Gally *et al.*, 2009).

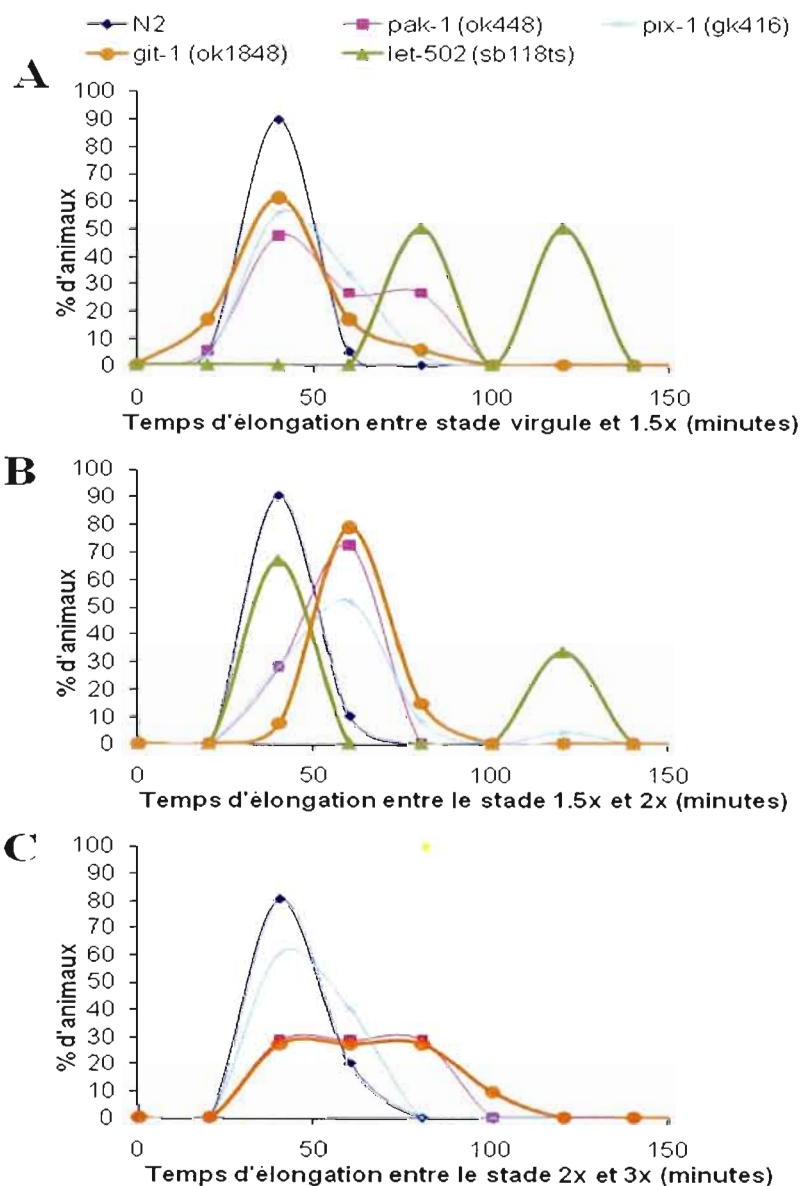


FIGURE 3-10: *pix-1*, *git-1*, *pak-1* ET *let-502* ONT UNE VITESSE D'ÉLONGATION RÉDUITE. **A)** Distribution des temps d'élongation entre le stade coma et 1.5x, **B)** Distribution des temps d'élongation entre les stades 1.5x et 2x, **C)** Distribution des temps d'élongation entre les stades 2x et 3x. Les distributions indiquent que *pix-1*, *git-1*, *pak-1* et *let-502* s'allongent plus lentement que les animaux sauvages.

### 3.3.6 LES HOMOLOGUES DE PAK-1, MAX-2 ET PAK-2 ET L'ÉLONGATION EMBRYONNAIRE

Il a été démontré lors de plusieurs processus cellulaires, dont l'élongation des gonades, que PAK-1 est redondant avec MAX-2 (Lucanic et Cheng, 2008) et il peut possiblement être redondant avec PAK-2 lors d'autres processus cellulaires. Donc, il a ensuite été tenté d'évaluer si tel était le cas dans le processus d'élongation embryonnaire. Pour ce faire, les mutants de *max-2* et *pak-2* ont été caractérisés phénotypiquement.

Ainsi, les mutants *max-2* et *pak-2*, ne présentent pas d'arrêt larvaire, cela indique qu'ils ne semblent pas présenter de défaut d'élongation embryonnaire comme ceux de *pak-1* (Table 3-7). Il est possible que *max-2* et *pak-2* ne présentent pas de phénotype justement à cause de la redondance mais, semblable à *pak-1*, il s'agirait d'allèle nul (Lucanic *et al.*, 2006). Par conséquent, on s'attendait à observer un phénotype d'arrêt larvaire, peu pénétrant tel que vu pour *pak-1*. Les mutants *max-2 (cy2)* et *pak-2 (ok332)* ont aussi été soumis à des traitements à la Blebbistatine et ML-7. Le traitement à la Blebbistatine induit un arrêt larvaire de 5% et 1% respectivement pour les allèles *max-2 (cy2)* et *pak-2 (ok332)* (Table 3-7). Ces valeurs ne sont pas significativement différentes, de l'arrêt larvaire induit chez les nématodes *wt*. La même tendance est observée suite au traitement de *max-2 (cy2)* et *pak-2 (ok332)* avec ML-7, ils présentent un arrêt larvaire respectif de 3 et 1%, et ne sont pas significativement différents par rapport aux nématodes *wt* traités avec ML-7 (Table 3-7). Ce qui montre, à l'évidence, qu'il n'y a pas d'aggravation du phénotype de NaLv dans le contexte des mutations nulles de *max-2 (cy2)* et *pak-2 (ok332)*.



TABLE 3-7 CARACTÉRISATION DE *max-2* ET *pak-2* ET DES INTERACTIONS AVEC LA MYOSINE II ET MLCK.

Génotype	Traitement	% NaLv	Nombre de vers
<i>wt</i>	Control	0	1249
<i>wt</i>	Blebb	2	1178
<i>wt</i>	ML-7	1	980
<i>max-2 (cy2)</i>	Control	0	1574
<i>max-2 (cy2)</i>	Blebb	5	927
<i>max-2 (cy2)</i>	ML-7	3	360
<i>pak-2 (ok332)</i>	Control	1	1569
<i>pak-2 (ok332)</i>	Blebb	1	1318
<i>pak-2 (ok332)</i>	ML-7	1	1577

### 3.3.7 REDONDANCE DE PIX-1 AVEC TIAM-1 AU COURS DE L'ÉLONGATION EMBRYONNAIRE

Les résultats indiquent que *pix-1* pourrait réguler les processus d'élongation précoce et tardive de manière redondante. En effet, la caractérisation phénotypique du triple mutant de *mel-11 (it26)*, *let-502 (sb118ts)*; *pix-1 (gk416)* a permis de montrer que *pix-1* contrôlerait l'élongation précoce et tardive en parallèle d'une autre voie. De là, peut être émise l'hypothèse qu'une seconde GEF possédant la même spécificité catalytique que *pix-1* puisse être impliquée dans cette voie. L'identification de cette GEF a été tentée. Cette GEF ne peut être *unc-73* étant donné que sa fonction pendant l'élongation semble être antagoniste à celle de *pix-1*. En effet, *unc-73* aggrave le phénotype de *mel-11* (Piekny, Wissmann et Mains, 2000), alors que *pix-1*, le réduit (Table 3-3, section 3.3.3). Un candidat s'est imposé soit, Tiam1. Effectivement Tiam-1, comme PIX, contrôle la formation des contacts cellules-cellules au niveau apical chez les mammifères (Chen et Macara, 2006 ; Liu *et al.*, 2004). Tiam a été démontrée comme un régulateur positif de l'activité de PAK-1 par Rac/Cdc42 (Zhou *et al.*, 1998), tout comme  $\alpha$ PIX (Daniels, Zenke et Bokoch, 1999). Finalement, Tiam1 est aussi impliquée dans la migration cellulaire en aval des intégrines (Cruz-Monserrate et O'Connor, 2008). Tiam1 semble donc s'imposer, du moins chez les mammifères, comme une GEF partageant plusieurs des fonctions de PIX, ce qui permet de supposer qu'il puisse avoir des fonctions redondantes ou palliatives dans le cas du dysfonctionnement de l'une des deux. Afin de vérifier si Tiam-1 est la GEF qui partage une redondance fonctionnelle avec *pix-1*



durant l'élongation chez le nématode, la souche RB907 du CGC a été obtenue. Cette souche porte une mutation dans le locus *C11D9.1*, le plus proche homologue de *Tiam1* chez le nématode, déterminée par alignements des séquences protéiques. Le CGC rapporte le site de la délétion pour la souche RB907. La souche RB907 portant une délétion de 800pb dans la séquence *C11D9.1* semble être un allèle nul puisque, suite à une analyse de la séquence, nous avons observé que la délétion, supprime le sixième intron, le septième exon et quelques acides aminés du septième intron. En considérant que cette délétion n'altérerait pas l'épissage de l'ARNm, la protéine résultante de cette délétion comporterait 100 acides aminés de moins que la protéine native délestant une grande partie du domaine GEF. Les acides aminés effacés dans la forme mutante couvrent le domaine 290 à 423 alors que le domaine catalytique RhoGEF s'étend des acides aminés 221 à 422. Par conséquent, il est possible d'affirmer que cette protéine devrait correspondre à une perte de fonction. Les différents allèles de *C11D9.1* ne présentent pas de phénotype de larves arrêtées, ni de phénotypes traduisant un défaut de l'embryogénèse. L'investigation sur l'implication potentielle de *Tiam1* au cours de l'élongation embryonnaire a tout de même été entreprise.

La caractérisation phénotypique de la souche RB907 a montré que cette mutation n'induit pas de phénotypes NaLv ni de létalité embryonnaire (Table 3-8). Les nématodes de la souche RB907 ont aussi été soumis à des traitements à la Blebbistatine, ML7 et Calyculin A afin de voir si la perturbation de la machinerie ACAM puisse mettre en évidence une fonction de TIAM-1 au cours de l'élongation. Le traitement à la Blebbistatine 50  $\mu$ M, induit un phénotype similaire à celui produit chez les nématodes sauvages soit 1% de NaLv (Table 3-8). Le traitement avec ML7 2  $\mu$ M n'engage aucun phénotype, tout comme chez les nématodes sauvages (Table 3-8). Finalement, le traitement à la Calyculin A 100nM, génère un phénotype similaire à celui induit chez les nématodes sauvages, donc un NaLv de 43% (Table 3-8). Cette valeur est significativement plus élevée que le phénotype des nématodes *wt* traités à la Calyculin A. Il est intéressant d'observer que *tiam-1(ok772)* ne réussit pas à réduire le phénotype induit par la Calyculin A, contrairement à *pix-1(gk416)*, mais qu'il l'aggrave tout comme *unc-73*.

TABLE 3-8 : CARACTÉRISATION PHÉNOTYPIQUE DE *C11D9.1(ok772)*

Génotype	Traitement	% NaLv	Nombre de vers
<i>wt</i>	Control	0	1249
<i>wt</i>	Blebb	2	1178
<i>wt</i>	ML-7	1	980
<i>wt</i>	Calyculin A	30	463
<i>C11D9.1</i>	Control	0	1160
<i>C11D9.1</i>	Blebb	1	1324
<i>C11D9.1</i>	ML-7	0	700
<i>C11D9.1</i>	Calyculin A	43*	31**

\*Test de Student  $p < 0.05$ , \*\*expérience effectuée 1 fois en triplica

### 3.4. IDENTIFICATION DES GTPASES IMPLIQUÉES DANS L'ÉLONGATION TARDIVE

PIX-1 étant une GEF des GTPases Rhos et GIT-1 étant une GAP des GTPases Arfs, il fallait identifier quelles GTPases étaient impliquées dans le processus d'élongation. Pour ce faire la technique d'ARNi par ingestion a été utilisée.

#### 3.4.1 INTERACTIONS AVEC LES GTPASES RHOS

Tel que détaillé dans l'introduction, des études génétiques suggèrent que la phosphorylation des CLMr au cours de l'élongation serait contrôlée par *rho-1*, *cdc-42*, *mig-2* et *ced-10/rac-2*. L'hypothèse avancée est que MLC-4 serait phosphorylée par LET-502, MRCK-1 et PAK-1 en aval de Rho-1 et CDC-42 tandis que MIG-2 et CED-10/RAC-2 pourraient favoriser sa déphosphorylation. Selon ce modèle, PIX-1 pourrait soit activer PAK-1 d'une manière GTPase-indépendante, comme il a déjà été démontré au cours de la morphogenèse des gonades (Lucanic et Cheng, 2008), ou activerait PAK-1 par CDC-42 ou une des protéines homologues de Rac. Pour valider cette hypothèse, la technique d'ARNi par ingestion fut utilisée. Un protocole visant à réduire le niveau d'expression de *cdc-42* et des *Racs* dans le contexte des mutants *pix-1*, *pak-1* et *git-1* a été mis au point. Le protocole a été spécialement conçu pour permettre l'éclosion d'une quantité significative d'œufs pondus par des hermaphrodites traités avec *cdc-42* (ARNi), tout en contrôlant l'efficacité de l'ARNi grâce à

l'observation de la létalité embryonnaire engagée par *cdc42* (ARNi) produite chez les animaux de type sauvage. Dans ces conditions, un pourcentage faible, mais significatif de la descendance d'animaux sauvages soumis à l'ARNi contre *cdc-42*, *crp-1*, *mig-2* et *rac-2* expriment le phénotype NaLv similaire à celui observé chez les mutants *pix-1* (*gk416*), *pak-1* (*ok448*) et *git-1* (*ok1848*), à l'exception de *ced-10*, qui n'est pas significativement différent de la condition *egfp* (Figure 3-11). Ceci suggère une implication de *cdc-42*, *mig-2*, *crp-1* et *rac-2* dans le processus d'élongation tardive. Deux tendances sont observées: les données recueillies montrent que le phénotype de NaLv associé aux allèles de *pix-1* (*gk416*), *pak-1* (*ok448*) et *git-1* (*ok1848*) est soit augmenté ou réduit suite au traitement avec l'ARNi contre les différentes GTPases Rhos (Figure 3-11). Ainsi, le phénotype NaLv associé aux allèles de *pix-1* (*gk416*), *pak-1* (*ok448*) et *git-1* (*ok1848*) est grandement augmenté suite au traitement à l'ARNi contre *cdc-42* (Figure 3-11). En conséquence au traitement avec l'ARNi contre *rac-2*, le phénotype NaLv est légèrement, mais significativement augmenté pour les allèles *pix-1* (*gk416*) et *git-1* (*ok1848*) (Figure 3-11). L'ARNi contre *mig-2* produit une réduction significative du phénotype de NaLv pour les allèles *pix-1* (*gk416*) et *pak-1* (*ok448*). L'ARNi contre *crp-1*, permet aussi une réduction significative du phénotype des allèles *pix-1* (*gk416*) et *git-1* (*ok1848*). Finalement, l'ARNi contre *ced-10* réduit sensiblement le phénotype NaLv de l'allèle *pak-1* (*ok448*). Ensemble, ces données soulignent un antagonisme fonctionnel entre *cdc-42/rac-2* et les GTPases *mig-2*, *crp-1* et *ced-10*.

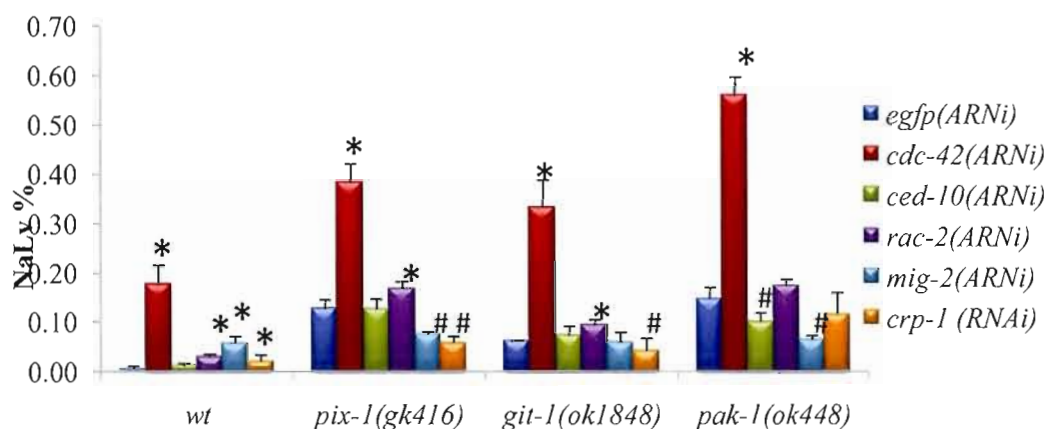


FIGURE 3-11: INTERACTION GENETIQUES DES GTPASES RHOS AVEC *pix-1*, *git-1* ET *pak-1*. Les nématodes *pix-1*, *git-1* et *pak-1* traités avec l'ARNi contre *cdc-42* expose une synergie pour l'aggravation du phénotype NaLv. L'expérience a été effectuée de 2 et 4 reprises et sur un nombre total minimal de 800 vers par condition. Test de Student : \*  $p < 0.05$  pour phénotype augmenté, #  $p < 0.05$  pour phénotype réduit.

Il faut mentionner que les données avec *rho-1* n'ont put être recueillies. En fait, le traitement à l'ARNi contre *rho-1*, produit une forte stérilité et ce même après une réduction des proportions d'ARNi contre *rho-1* avec l'ARNi contrôle *egfp*.

### 3.4.2 ÉPISTASIE DES INTERACTIONS GÉNÉTIQUES AVEC LES GTPASES RHOS

Afin d'émettre des conclusions sur ces résultats il est nécessaire d'évaluer précisément la nature de ces interactions génétiques. Pour ce faire il est préférable d'utiliser le calcul du coefficient d'épistasie ( $E_c$ ) qui se base sur un modèle mathématique additif (Lee *et al.*, 2010). Selon ce modèle, le double mutant exprimant un phénotype plus important que celui attendu selon la somme des phénotypes des deux simples mutants, correspond à une épistasie synergique (soit  $E_c < 0$ ). Si le double mutant exprime un phénotype moins intense que la somme des deux simples mutants, se reflétera alors une épistasie antagoniste entre les deux gènes (soit  $E_c > 0$ ). Finalement si le phénotype du double mutant est tel qu'attendu par rapport à la somme des phénotypes des deux simples mutants, il y a absence d'épistasie (additivité), soit  $E_c = 0$ . Sur la base du calcul d' $E_c$ , il est établi que l'ARNi contre *cdc-42* présente une épistasie synergique avec *pix-1 (gk416)*, *pak-1 (ok448)* et *git-1 (ok1848)* (Figure

3-12). Alors que *mig-2* et *crp-1* présentent une épistasie antagoniste avec *pix-1* (*gk416*), *pak-1* (*ok448*) et *git-1* (*ok1848*). De plus, *ced-10* présente une épistasie antagoniste avec *pak-1* (*ok448*) (Figure 3-12).

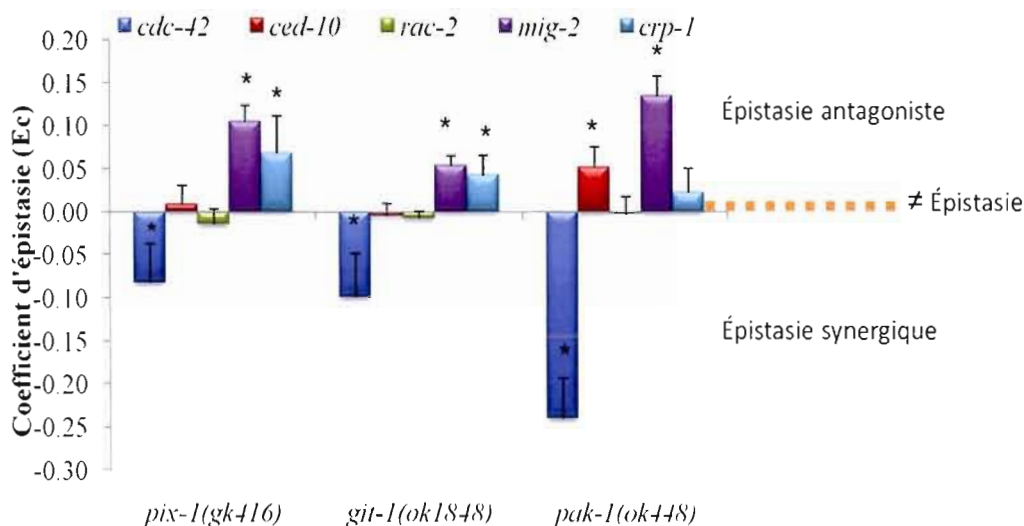


FIGURE 3-12 : CARACTERISATION DES INTERACTIONS GENETIQUES PAR LE COEFFICIENT D'EPISTASIE. L'épistasie synergique entre *pix-1*, *git-1*, *pak-1* et *cdc-42* est clairement mise en évidence, ainsi que l'antagonisme avec les Racs, *mig-2*, *ced-10* et *crp-1*. Test de Student \*  $p < 0.05$ .

### 3.3.2 INTERACTIONS ENTRE *max-2*, *pak-2* ET LES GTPASES RHOS

La littérature rapporte, qu'un transgénique constitutivement actif de CED-10, présente de la létalité embryonnaire résultant d'un trouble d'élongation (dans ce cas précoce) (Pedone *et al.*, 2008). Il est allégué par les auteurs que, dans le contexte où CED-10 est CA, le trouble d'élongation est supprimé lorsque l'activité de *max-2* est altérée, alors que dans les mêmes conditions, l'altération de l'activité de *pak-1* aggrave le trouble d'élongation. Ces résultats suggèrent selon les auteurs que *max-2* est l'effecteur de *ced-10* et non pas *pak-1* (Pedone *et al.*, 2008). Il faut noter qu'un phénotype, tel qu'un arrêt d'élongation, peut autant être produit par une GTPase CA que DN. Il est intéressant de remarquer que l'ARNi contre *ced-10*, n'a pas d'effet en soi, mais il altère le phénotype de *pak-1(ok448)* de manière antagoniste et ne



présente pas d'épistasie avec *pix-1* et *git-1*. Afin d'identifier si *max-2* ou *pak-2* pourraient avoir une fonction dans le processus d'élongation tardive et les positionner par rapport à *pak-1* et *ced-10* une expérience est réalisée où l'on traite les mutants *max-2(cy2)* et *pak-2(ok332)* avec le RNAi contre les GTPases. Les résultats montrent déjà que *pak-1* et *ced-10* sont fort probablement dans des voies parallèles antagonistes, ou alors que *pak-1* inhiberait *ced-10* se situant en aval (Figure 3-12). En utilisant la même stratégie pour le traitement à l'ARNi et le calcul de l'épistasie, on observe que l'altération de l'expression de *ced-10* dans le contexte de la mutation nulle de *max-2*, donne une épistasie synergétique, alors que la mutation de *pak-2*, donne une épistasie antagoniste, comme pour *pak-1* (Figure 3-13).

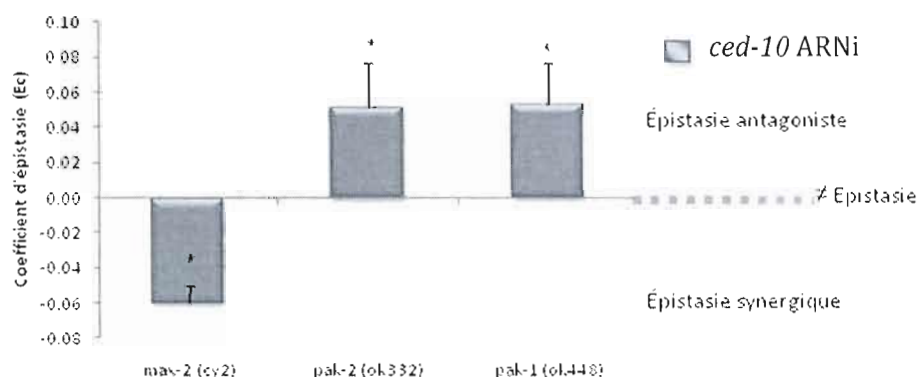


FIGURE 3-13: RELATIONS D'ÉPISTASIE DE *max-2*, *pak-2* ET *ced-10*. Le calcul du coefficient d'épistasie montre que *max-2* a une relation synergétique avec *ced-10* alors que *pak-2* est antagoniste à *ced-10*, tout comme *pak-1*. L'étude a été effectuée sur 200 à 600 nématodes pour chaque condition. Test de student \* $p < 0.05$ .

### 3.4.3 INTERACTIONS AVEC LES GTPASES ARFS

L'étude a exposé que *git-1 (ok1848)*, était impliqué dans le processus d'élongation embryonnaire puisque le mutant présente un phénotype NaLv, une légère létalité embryonnaire, une vitesse d'élongation réduite, et un profil d'interaction chimio-génétique similaire à *pak-1 (ok448)* et *pix-1 (gk416)*, clairement identifiés pour leur fonction dans le processus d'élongation. Puisque *git-1* code pour une GAP des GTPases Arfs, il faut identifier les GTPases Arfs impliquées dans le processus d'élongation. Toujours avec la même

approche d'ARNi et en observant le phénotype de NaLv, les mutants *pix-1 (gk416)*, *pak-1(ok448)* et *git-1 (ok1848)* ont été traité avec l'ARNi contre *arl-1*, *arl-6*, *arl-5*, *arl-3*, *arf6* et *arf1.1*. Les résultats obtenus montrent qu'*arl-3*, *arl-5* et *arf-6*, présentent une épistasie antagoniste avec *pix-1 (gk416)*, *pak-1 (ok448)* et *git-1 (ok1848)* (Figure 3-14). Ceci indique qu'*arl-3*, *arl-5* et *arf-6* ont une fonction antagoniste à celle de *pix-1*, *git-1* et *pak-1* dans le processus d'élongation tardive. Vu la présence de cette relation antagoniste, il est possible d'émettre l'hypothèse selon laquelle *arl-5*, *arl-3* et *arf-6* sont les GTPases qui sont régulées par *git-1*. Il faut aussi remarquer qu'*arl-6* présente une épistasie aggravante avec *pix-1* et *git-1*, alors qu'il a une épistasie antagoniste avec *pak-1*. Ainsi, *arl-6*, peut donc se positionner en parallèle de *pix-1* et *git-1* et partager une redondance fonctionnelle avec ces derniers, *arl-1*, ne présente aucune épistasie avec *pix-1* (Figure 3-14). En contraste, *arl-1* présente une épistasie aggravante avec *git-1* et antagoniste avec *pak-1* (Figure 3-14). Ce résultat indique qu'il est possible que *arl-1* puisse être une GTPase Arf, fonctionnant en parallèle de *git-1* et qui a une redondance fonctionnelle avec *git-1*, tout en étant antagoniste à *pak-1*. Les interactions génétiques avec la GTPase *arf-1.1*, n'ont pu être évaluées puisque le traitement ARNi contre *arf-1.1* induisait une très forte létalité embryonnaire. Il semblerait que l'interaction présente une tendance aggravante mais, considérant le faible taux de viabilité il est difficile d'interpréter ces données.



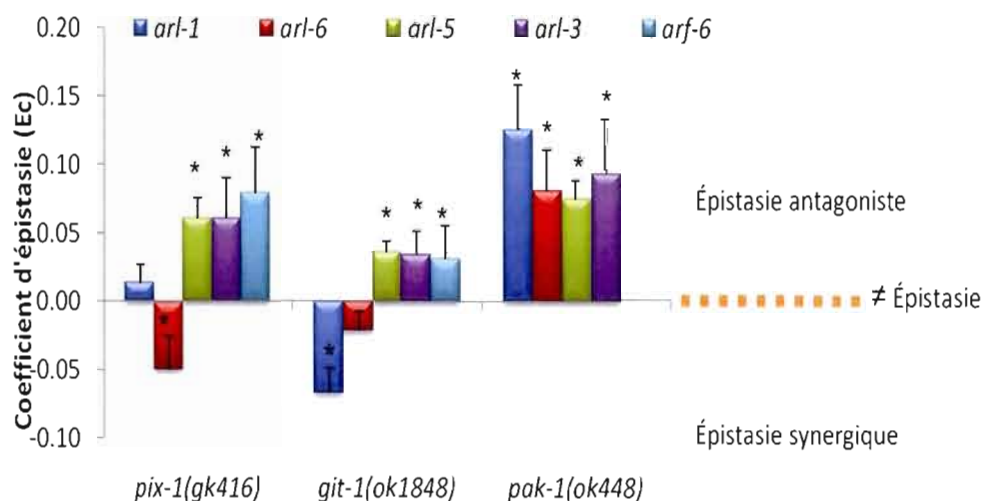


FIGURE 3-14: ÉPISTASIE DES GTPASES ARFS AVEC *pix-1*, *git-1* ET *pak-1*. En utilisant le calcul du coefficient d'épistatie, une épistatie antagoniste a été mise en évidence entre *pix-1/git-1/pak-1* et *arl-3*, *arl-5* et *arl-6*. Une épistatie antagoniste est aussi présente entre *pak-1* et *arl-6/arl-1*, alors qu'une épistatie synergique a été établie entre *pix-1*, *git-1* et *arl-6/arl-1*. Test de Student \* $p < 0.05$ ,  $n > 2$  et 250 vers/expérience/ condition

### 3.5 INTERACTION AVEC LES COMPOSANTES DES CORPS DENSES

#### 3.5.1 INTERACTIONS GÉNÉTIQUES ENTRE *ina-1* ET *pix-1/pak-1 / git-1* DANS LE PROCESUS D'ÉLONGATION TARDIVE.

Chez les mammifères le complexe PIX/GIT/PAK a été signalé comme jouant un rôle majeur dans la régulation de la mobilité des complexes d'adhésion focaux (Zhao *et al.*, 2000). Chez les mammifères les complexes d'adhésion focaux, comprennent les intégrines, la paxillin, l'acto-paxin, MLCK et plusieurs autres protéines. Chez le nématode, l'équivalent des complexes d'adhésion focaux se retrouve dans les corps denses (Cox et Hardin, 2004). Les corps denses sont des structures combinant l'attachement à la matrice extracellulaire, par les intégrines. Encore une fois, de façon intéressante, il a été établi que *pix-1*, *git-1* et *pak-1* régulent l'élongation des gonades au cours du développement larvaire en aval des intégrines *ina-1* (Lucanic et Cheng, 2008). De plus, les animaux portant l'allèle hypomorphe de

*ina-1(gm144)* présentent le même phénotype que les mutants de *pix-1(gk416)* suggérant un rôle de *ina-1* dans les étapes tardives de l'élongation. Afin d'évaluer le lien fonctionnel entre *pix-1*, *git-1* et *pak-1* avec les composantes des corps denses, dont *ina-1*, *pat-6*, l'orthologue d'acto-paxine et *pxl-1*, l'orthologue de la paxillin, l'épistasie, a été évaluée en traitant différents mutants de ces gènes au ARNi par ingestion.

Un traitement des mutants *pix-1*, *pak-1* et *git-1* avec l'ARNi contre *ina-1* ainsi que le mutant *ina-1* avec l'ARNi contre *git-1* et *pak-1* ont été effectués. Afin de confirmer l'efficacité et la spécificité de l'ARNi contre *ina-1*, deux conditions contrôles ont été considérées. Les résultats ont été considérés seulement lorsque le contrôle *ina-1* (ARNi) sur *ina-1 (gm144)* présentait une stérilité de 100%. Le second contrôle interne était le traitement *ina-1*(ARNi) sur les nématodes *wt* qui présentait un phénotype quantitativement équivalent au phénotype de l'allèle hypomorphe *ina-1 (gm144)* (Figure 3-15A). Dans ces conditions, il a été observé que les mutants nuls *pix-1 (gk416)* et *pak-1 (ok448)* ne sont pas affectés par le traitement à l'ARNi contre *ina-1* alors que le phénotype NaLv des mutants hypomorphes *pix-1 (ok982)* et *git-1(ok1848)*, sont significativement aggravés (Figure 3-15A). Inversement lorsque le mutant hypomorphe *ina-1 (gm144)* est traité avec l'ARNi contre *git-1* ou *pak-1*, le phénotype NaLv est significativement aggravé (Figure 3-15B). Ensemble ces résultats démontrent, que *ina-1* fonctionnerait en amont de *pix-1*, *git-1* et *pak-1*, dans le processus d'élongation tardive.

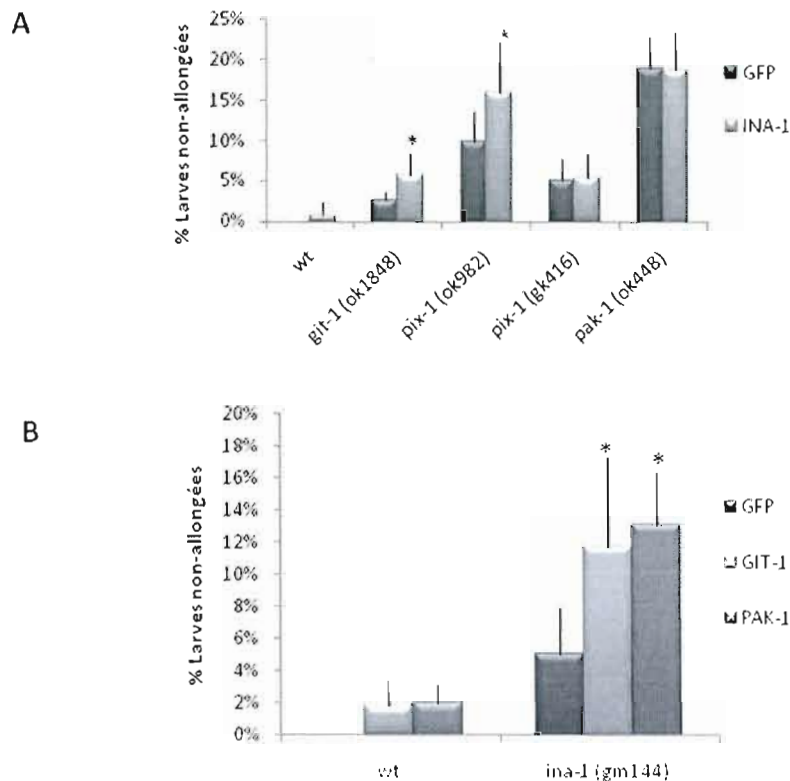


FIGURE 3-15 : *ina-1* SIGNALISE VIA *pix-1*, *git-1* ET *pak-1* LORS DE L'ELONGATION TARDIVE. A) Le traitement à l'ARNi contre *ina-1* induit une aggravation du phénotype NaLv seulement chez les mutants *pix-1 (ok982)* et *git-1 (ok1848)* et non chez les mutants nuls *pix-1 (gk416)* et *pak-1 (ok448)*. B) Le traitement du mutant *ina-1 (gm144)* avec les ARNi contre *git-1* et *pak-1* induit une aggravation significative du phénotype NaLv. Test de Student \*  $p < 0.05$ ,  $n = 3$  et  $\geq 170$  vers/expériences/condition

### 3.5.2 INTERACTIONS GÉNÉTIQUES ENTRE *git-1/pak-1* ET *pat-6* ET *pxl-1*

Il s'avère que *pat-6* code pour un orthologue de l'acto-paxin, une protéine impliquée dans la régulation de l'adhérence cellulaire. Chez les mammifères, l'acto-paxin lie paxillin, tout comme PIX/GIT/PAK, pour le remodelage du cytosquelette d'actine, lors de l'adhérence cellulaire (Nikolopoulos et Turner, 2000). Chez le nématode PAT-6 joue un rôle dans l'organisation des complexes d'attachement focaux (impliquant les intégrines PAT-2 et PAT-3) responsables de l'attachement des muscles à la matrice extracellulaire et aux cellules de l'hypoderme. Une elongation normale nécessite, une interaction muscle/hypoderme

inaltéré. Alors, a été mis en évidence que le phénotype NaLv résulte probablement d'une signalisation altérée des intégrines, qui participent à l'intégrité de l'interaction muscle/hypoderme. Afin de vérifier si le phénotype d'élongation tardive serait en relation avec la formation et/ou le maintien des corps denses, il y a eu l'évaluation des interactions génétiques de *pix-1*, *git-1* et *pak-1* avec *pat-6* et *pxl-1* deux autres composantes des corps denses. Pour ce faire, la technique d'ARNi a été mise en oeuvre.

Ainsi il a été mis en évidence que *git-1*(ARNi) supprime la létalité embryonnaire (arrêt d'élongation au stade 2x) des mutants *pat-6(st561)* (Figure 3-16A). Il a aussi été souligné que l'ARNi contre *pak-1* amène une réduction significative du phénotype NaLv dans le mutant *pxl-1(ok1483)* (Figure 3-16B). Il faut noter qu'aucune interaction n'a été observée entre *pix-1* et *pat-6* ou *pxl-1* et aucune interaction entre *pak-1/pat-6* et *git-1/pxl-1* (donnée non montrées puisque non significatives). Ces résultats indiquent un antagonisme entre *git-1* et *pat-6*, ainsi qu'un antagonisme entre *pxl-1* et *pak-1*.

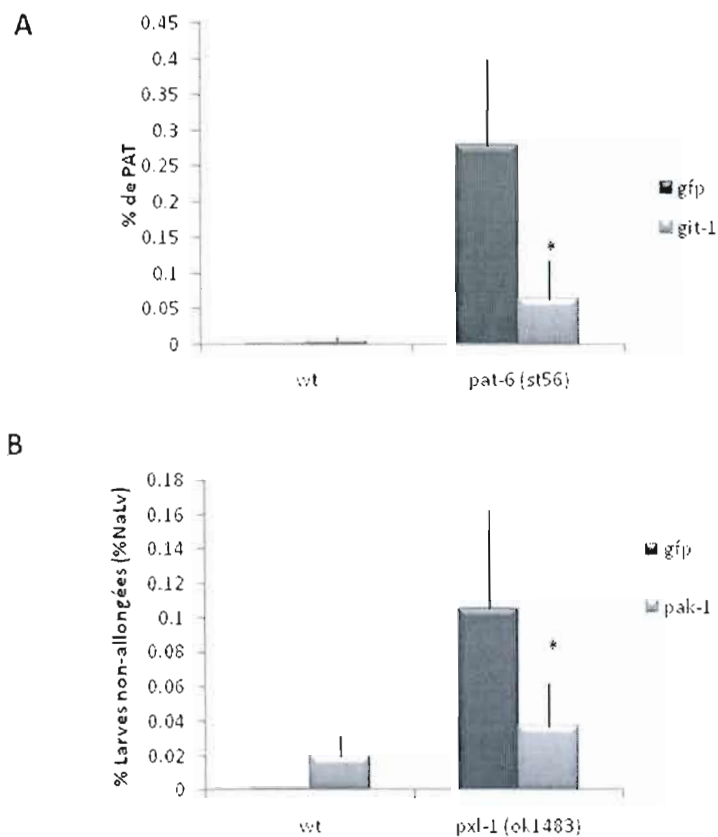


FIGURE 3-17 : *git-1* ET *pak-1* SONT ANTAGONISTES A *pat-6* ET *pkl-1*. **A)** Le traitement de *pat-6(st56)* par l'ARNi contre *git-1* entraîne une réduction significative du phénotype PAT. **B)** Le traitement de *pkl-1(ok1483)* par l'ARNi contre *pak-1*, entraîne une réduction significative du phénotype de *pkl-1*. Test de Student \*  $p < 0.01$ ,  $n = 3$  et  $> 200$ /conditions.

## CHAPITRE 4

### RÉSULTATS : *pix-1* ET SA FONCTION NEURONALE

#### 4.1 CARACTÉRISATION PHÉNOTYPIQUE COMPORTEMENTALE

L'implication de diverses protéines dans la transduction des signaux neuronaux peut se traduire par l'altération d'un comportement chez le nématode, lorsque ces dernières sont mutées. Ces comportements peuvent-être par exemple : une ponte, une locomotion ou, une chémo-sensation altérée. Afin d'identifier si *pix-1* est impliquée dans la régulation de certains mécanismes neuronaux, une caractérisation comportementale des animaux mutants pour *pix-1* a été entreprise.

##### 4.1.1 *pix-1 (gk416)* PRÉSENTE UN TAUX DE DÉFÉCATION ET DE PONTE ALTÉRÉ

Les mutants *pix-1 (gk416)* présentent une ponte altérée. En fait, les nématodes *pix-1 (gk416)* pondent à un taux réduit, puisqu'on retrouve à un temps donné, un nombre plus important d'embryons au niveau de l'utérus, lorsque comparés aux nématodes *wt* (Figure 4-1A). Ces résultats sont aussi corroborés par un taux de ponte significativement réduit chez les mutants *pix-1 (gk416)* lorsque comparés aux nématodes *wt* (Figure 4-1B). La ponte chez le nématode est contrôlée par des processus neuronaux. Ces résultats indiquent que la mutation *pix-1 (gk416)* pourrait perturber la ponte, par l'altération de certains mécanismes neuronaux. De plus, les nématodes *pix-1 (gk416)* sont constipés et ont un cycle de défécation (temps entre deux contractions intestinales) significativement plus long comparativement aux nématodes *wt* (Figure 4-1C), soit respectivement  $55 \pm 11$  vs  $44 \pm 4$  s. De manière intéressante il a aussi été constaté que le cycle de défécation était arythmique pour *pix-1 (gk416)*. Les contractions ont lieu à des intervalles de temps passant de 40 à 80 s, pour un même vers, alors que les vers *wt*

présentaient des intervalles plus constants. Ce fait est traduit par les écarts types; dans le cas de *pix-1 (gk416)*, l'écart type de 11 s est trois fois plus important que l'écart type des *wt*, ce qui représente une plus grande dispersion des temps de contractions par rapport à la moyenne. La défécation dépend 1) de processus neuronaux qui régulent le rythme des contractions et 2) de processus musculaires et neuro-musculaires qui produisent la contraction. Donc, un trouble de défécation peut traduire une altération du programme neuronal qui permet de maintenir le rythme des contractions intestinales, ou encore d'une altération du programme de contractions musculaires, qui permet de provoquer les contractions de l'appareil digestif, ou la somme des deux phénomènes. Dans les deux cas, ce phénotype peut résulter d'une fonction neuronale altérée. Finalement, les mutants *pix-1 (gk416)* présentent un troisième phénotype qui consiste en une augmentation de la fréquence de mouvements latéraux de la tête en présence de nourriture (Figure 4-1D). La fréquence des mouvements latéraux de la tête est un comportement locomoteur rythmique tout comme la défécation. Les changements du comportement locomoteur peuvent refléter un défaut de la plasticité dans le traitement des informations sensorielles. Ensemble ces trois phénotypes peuvent traduire l'implication potentielle de *pix-1* dans un processus neuronal.



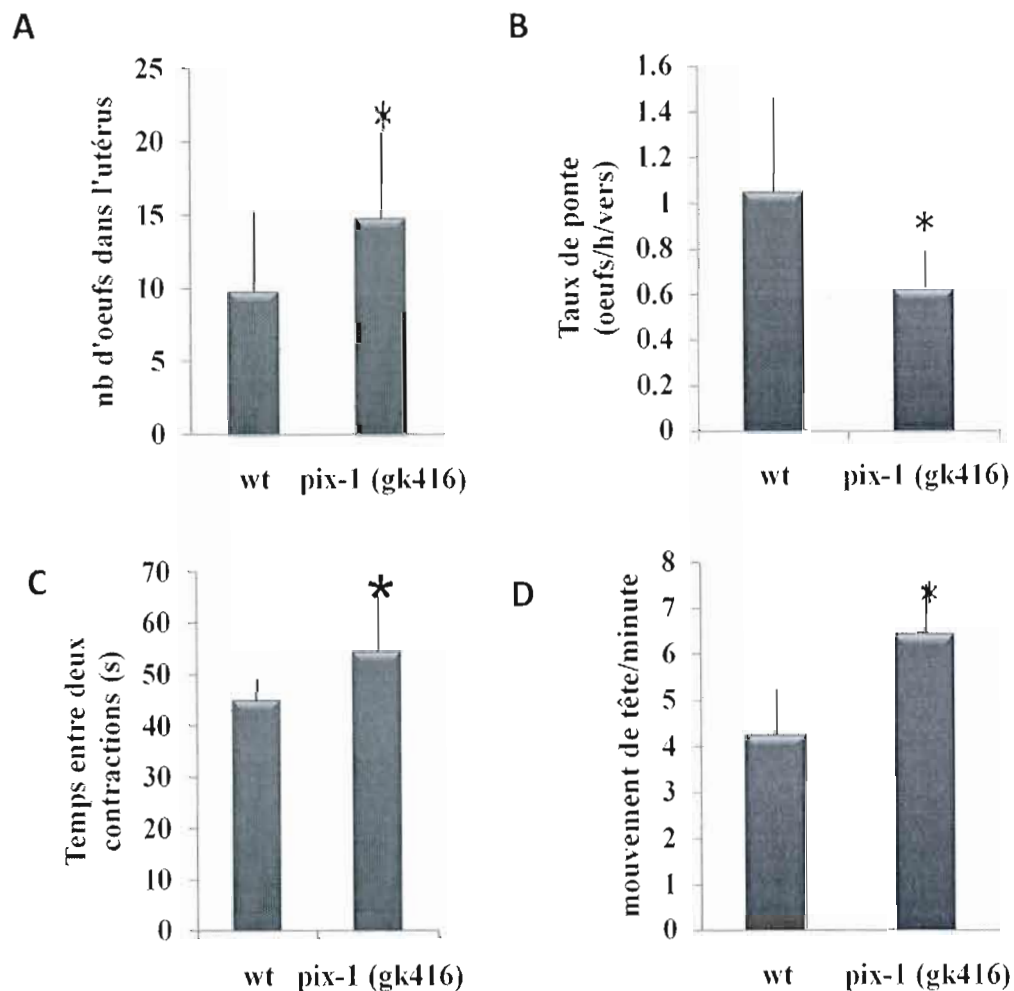


FIGURE 4-1: *pix-1* ALTERE DIFFERENTS COMPORTEMENT CHEZ LE NEMATODE. **A)** *pix-1* présente une altération de la ponte, puisque le mutant présente une accumulation d'embryon dans l'utérus et **B)** un taux de ponte (œufs/h/vers) significativement réduit lorsque comparé au contrôle. **C)** *pix-1* présente aussi une réduction du taux de défécation puisque le temps entre deux contractions intestinales est significativement plus long lorsque comparé au contrôle et finalement **D)** *pix-1*, présente une augmentation des mouvements de la tête de gauche à droite en présence de nourriture. \* Test de Student **A)**  $p < 0.05$ , **B)**  $p < 0.05$  **C)**  $p < 0.001$ , **D)**  $p < 0.0001$

#### 4.1.2 *pix-1* RÉGULE LE COMPORTEMENT DE FORAGE

Nous avons aussi observé une altération du comportement de forage des mutants *pix-1(gk416)* en l'absence de nourriture. En fait, les animaux *pix-1 (gk416)* présentent une

fréquence accrue de reculons en absence de nourriture lorsque comparée aux animaux *wt* (Figure 4-2A-B). Les nématodes *pix-1(gk416)* reculent plus souvent dans les 15 premières minutes suivant leur dépôt dans un plat exempt de nourriture, et ceci résulte en une diminution significative du temps d'avancement lorsque comparé au nématode *wt* (Figure 4-2C) au cours du comportement de recherche en zone restreinte (RZR). Des résultats préliminaires indiquent que cette fréquence élevée de recule maintiendrait au-delà de 30 minutes (résultats non montrés) suggérant aussi, une altération du comportement de dispersion.

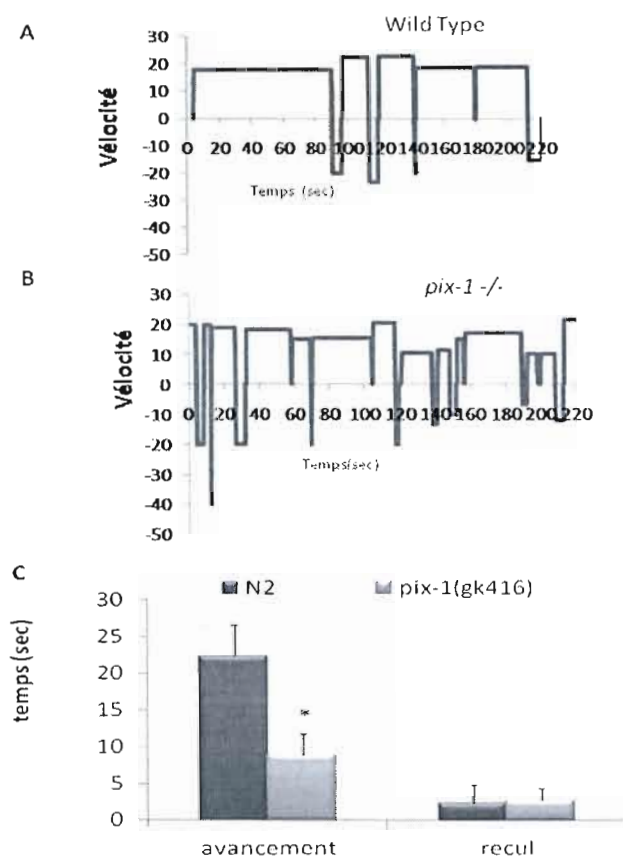


FIGURE 4-2 : LES ANIMAUX *pix-1(gk416)* ONT UN COMPORTEMENT DE RECHERCHE DE NOURRITURE ALTERÉ. **A**) En absence de nourriture les nématodes adoptent un comportement de recherche de nourriture qui se traduit par une augmentation de la fréquence de recul **B**) Ce comportement est exagéré pour les mutants *pix-1(gk416)* qui reculent en moyenne plus fréquemment **C**) Résultant en un temps d'avancée en moyenne plus court que les animaux sauvages \* Test de Student  $p < 0.05$

Le comportement de recherche de nourriture en zone restreinte (RZR) est défini comme une augmentation du taux de reculs et de tours des animaux en l'absence de nourriture. Le contrôle de ce comportement dépend de la neurotransmission glutamatergique et implique des mécanismes cellulaires similaires à la plasticité synaptique chez les mammifères. Ce comportement dépendrait de l'accumulation de GLR-1, NMR-1 et MGL-1 et des récepteurs dopaminergiques au niveau post-synaptique des membranes d'inter-neurones comprises dans le contrôle du taux de reculs (Zheng *et al.*, 1999). Ainsi nos résultats corrélent avec un rôle de *pix-1* comme régulateur négatif de la signalisation contrôlant le mouvement de reculs durant le comportement de RZR.

#### 4.1.3 *pix-1* ET *git-1* RÉGULENT LE COMPORTEMENT DE NAVIGATION DANS LES ENVIRONNEMENTS COMPLEXES

Afin de faciliter la dissection génétique des voies de signalisation régulée par *pix-1* et contrôlant le comportement de forage, un nouveau test a été développé pour l'étude du comportement permettant une quantification rapide et précise des comportements de navigation. Tel que rapporté dans la littérature des mutants présentant des défauts dans leur comportement de forage, comme les mutants perte de fonction de NMR-1, présentent également une navigation altérée dans les environnements complexes (Qin et Wheeler, 2007). L'étude et des tests de la capacité des nématodes *pix-1(gk416)* et *git-1(ok1848)* à naviguer vers un chémo-attractant, le benzaldéhyde, dans un canal de 1mm de large, 2cm de long et 150µm de haut construit en PDMS, furent entrepris. Lors de cette étude, force est de constater que de façon similaire à des mutants de récepteurs au glutamate *nmr-1* et *glr-1*, les mutants de *pix-1* et *git-1* présentaient des difficultés à naviguer dans le labyrinthe (Figure 4-3A). Ce défaut de navigation n'est pas dû à une altération du chimiotactisme des nématodes mutants vers le benzaldéhyde, puisque dans un contexte sans frontière, ils migrent à 100% vers la source de benzaldéhyde (Figure 4-3B). De plus, lorsque les nématodes sont libre de naviguer pour une période plus longues (2h), ils arrivent à l'extrémité du labyrinthe dans les mêmes proportions que les nématodes sauvages (données non montrées). Ces résultats indiquent que *pix-1* et *git-1*, prennent plus de temps à atteindre l'extrémité, et donc qu'ils naviguent/s'orientent plus difficilement que les nématodes *wt*.

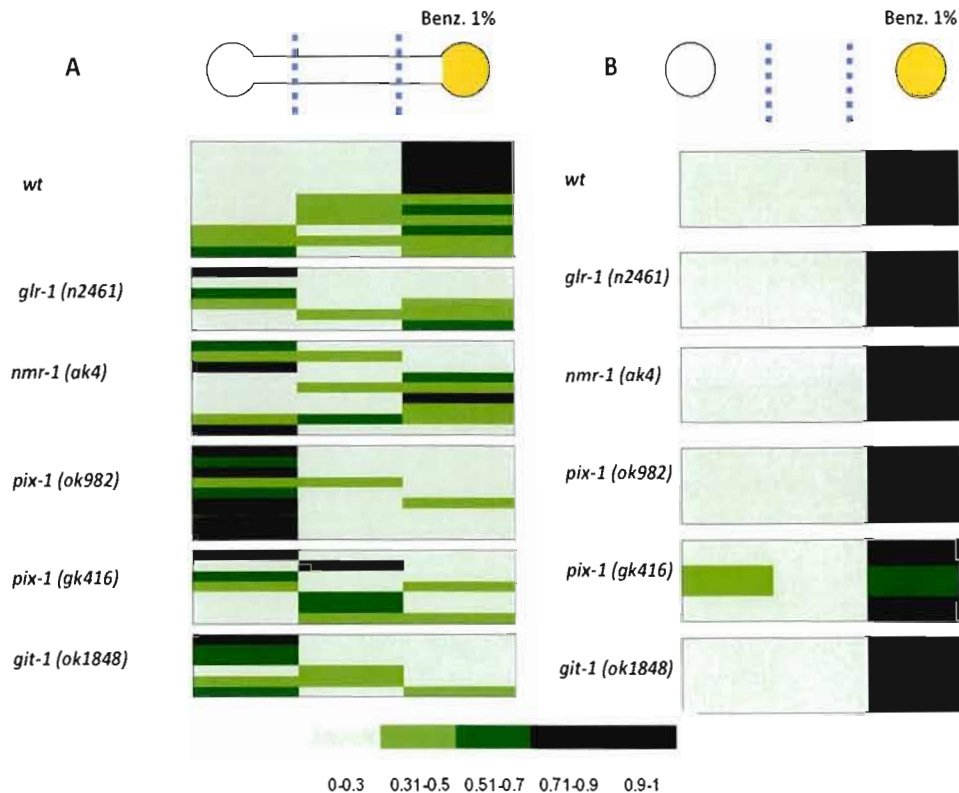


FIGURE 4-3: *pix-1* ET *git-1* MONTRENT UNE NAVIGATION ALTEREE. Les nématodes sont déposés à l'entrée d'un couloir de PDMS et sont laissés libres de naviguer pour une période d'une heure avant de noter leurs positions. Les mutants perte de fonction *nmr-1* et *glr-1* présentent une capacité réduite à naviguer dans un couloir de PDMS. De façon similaire les mutants *pix-1* et *git-1* présentent aussi une capacité réduite de navigation dans cet environnement complexe. **B)** En plaçant les nématodes et le benzaldéhyde à une distance équivalente à la longueur du couloir, en éliminant le couloir, les nématodes présentent tous un chimiotactisme normal vers le benzaldéhyde. L'augmentation de l'intensité de la couleur verte, correspond à l'augmentation de la densité de nématodes retrouvés dans chacune des sections.  $n \geq 3$  expériences et nb de vers  $\geq 100$ .

Fait intéressant à noter, une étude du comportement de souris portant une mutation nulle dans le gène  $\alpha$ PIX a révélé des altérations du comportement de navigation en piscine et d'adaptation à de nouveaux objectifs et environnements (Welzl, 2006). Ceci suggère une implication d' $\alpha$ PIX dans l'intégration des informations spatiales chez la souris et il semblerait que ce constat s'applique aussi chez le nématode.

## 4.2 PIX-1 RÉGULE LA SIGNALISATION GLUTAMATERGIQUE

Comme précédemment mentionné, le contrôle du comportement de recherche de nourriture dépend de la neurotransmission glutamatergique et dopaminergique et il exige l'activation des orthologues des récepteurs au glutamate AMPAR, NMDAR et mGluR (GLR-1, NMR-1, MGL-1 et DOP-1/2 respectivement). Il implique également le ciblage de ces récepteurs aux membranes post-synaptiques (Burbea *et al.*, 2002). Les mutants perte de fonction de NMR-1, GLR-1, MGL-1, DOP-2/3 présentent une réduction de la fréquence de reculs lors du comportement de RZR, alors que les mutants perte de fonction de la machinerie d'endocytose et de dégradation de ces récepteurs ainsi que les mutants gain de fonction de ces mêmes récepteurs, présentent une augmentation de la fréquence de reculs lors de la RZR, tout comme le mutant *pix-1*. Ces données suggèrent donc que *pix-1* a une fonction antagoniste à NMR-1, GLR-1, MGL-1 et DOP-2/3. Il a été révélé chez les mammifères que GIT/PIX/PAK, contrôle l'adressage des récepteurs AMPAR aux membranes post-synaptiques des neurones de l'hippocampe (Ko *et al.*, 2003). Il fallait vérifier si le rôle de *pix-1* dans le contrôle du comportement en RZR dépendait de son implication dans le ciblage ou de l'expression de GLR-1. Pour évaluer le rôle de *pix-1* dans ces processus, des vers transgéniques mutants GLR-1::GFP; *pix-1* (*gk416*), furent générés.

### 4.2.1 PIX-1 RÉGULE L'EXPRESSION DE GLR-1 ::GFP

Afin de confirmer l'implication de *pix-1* dans le contrôle de l'expression de GLR-1::GFP nous avons utilisé le trieur automatique de vers (COPAS biosort) pour mesurer le niveau d'expression global de GLR-1::GFP dans le contexte *wt* et le contexte du mutant *pix-1* (*gk416*). Dans des conditions normales de croissance, l'accumulation de GLR-1::GFP est significativement réduite pour les mutants *pix-1* (*gk416*) par rapport aux animaux *wt* (Figure 4-4) suggérant que *pix-1* permettrait de contrôler l'accumulation globale du GLR-1 dans le vers. *pix-1* aurait ainsi une fonction qui permet de contrôler le niveau d'expression de GLR-1::GFP, par un mécanisme qui reste à identifier.

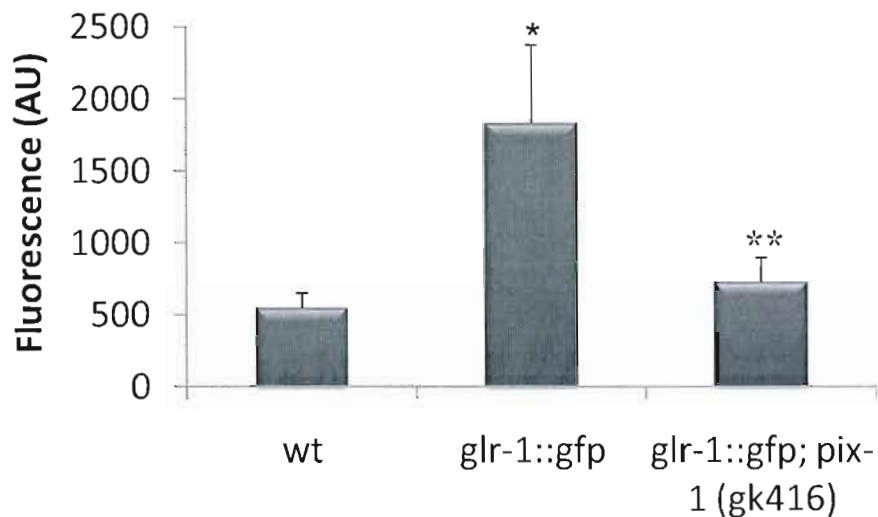


FIGURE 4-4: PIX-1(GK416) REDUIT LE NIVEAU D'EXPRESSION DE GLR-1::GFP. La fluorescence totale des nématodes a été mesurée avec le COPAS BIOSORT. Les nématodes GLR-1::GFP présentent une fluorescence significativement supérieure à l'auto-fluorescence du nématode wt par un facteur 4x. La fluorescence total de GLR-1::GFP; est inférieure dans le contexte de *pix-1(gk416)*. Test de Student : \*  $p < 0.01$  comparé à wt, \*\* $p < 0.01$  comparé à *glr-1::gfp* ( $n=3$  et nb de vers  $\geq 300$  par expérience).

#### 4.2.2 PIX-1 RÉGULE L'ACCUMULATION DE GLR-1::GFP AUX MEMBRANES POST-SYNAPTIQUES

Par la suite, afin de déterminer si *pix-1* contrôle aussi le trafic de GLR-1 aux membranes post-synaptiques, il fut quantifié par microscopie à fluorescence semi-quantitative l'accumulation de la fusion traductionnelle GLR-1::GFP au niveau de la corde ventrale, contenant les domaines post-synaptiques de l'interneurone AVA qui contrôle la fréquence de reculs. L'étude a démontré que les récepteurs GLR-1::GFP s'accumulaient de façon plus importante dans les animaux *pix-1(gk416)* que dans les animaux sauvages (Figure 4-5). Ces résultats supposent une plus forte accumulation de GLR-1::GFP au niveau post-synaptique par rapport au corps cellulaire et sont en accord avec les résultats comportementaux obtenus

avec ces mutants qui dénotent une augmentation de la signalisation glutamatergique dans les animaux *pix-1(gk416)*.

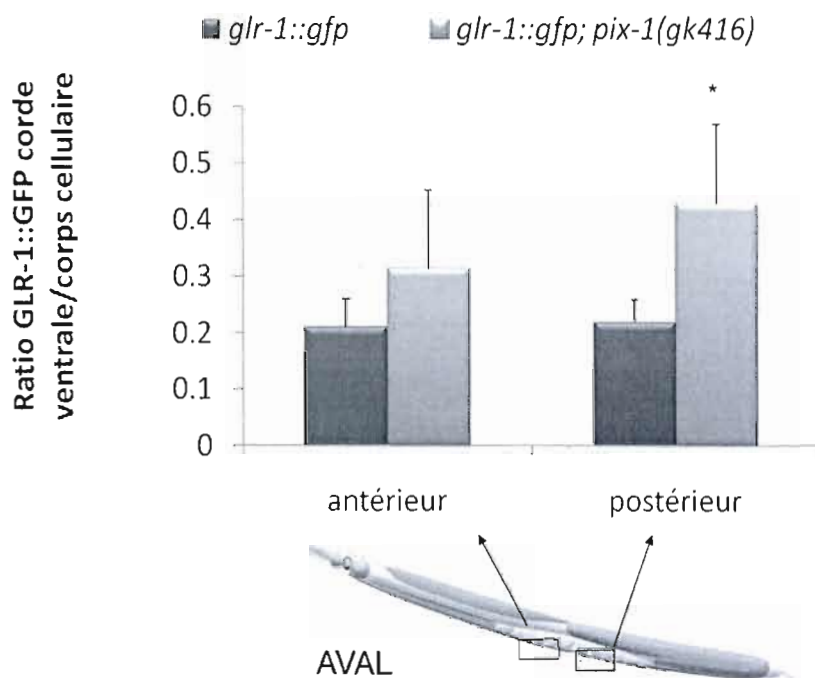


FIGURE 4-5 : GLR-1 ::GFP S'ACCUMULE AU NIVEAU POST-SYNAPTIQUE CHEZ LE MUTANT *pix-1*. Par microscopie à fluorescence, la fluorescence relative émise au niveau de la corde ventrale et du corps cellulaire de l'interneurone AVAL a été mesurée. Le rapport de la fluorescence dans la corde ventrale et le corps cellulaire a été obtenu. Les mutants *pix-1 (gk416)*, présentent une accumulation de GLR-1:: GFP à la corde ventrale. Test de Student \* $p < 0.05$ ,  $n = 10$  animaux par condition

Ensuite fut quantifié le nombre de synapses exprimant GLR-1 ::GFP en dénombrant les points fluorescents présent le long de la corde ventrale. L'étude a mis en évidence que les mutants *pix-1 (gk416)* comprennent un nombre légèrement mais significativement réduit de synapses exprimant GLR-1 ::GFP (Figure 4-6). Par contre, des les points de fluorescence dénombré chez les mutants *pix-1 (gk416)*, ont une intensité, plus importante d'un facteur 2X (Figure 4-6).



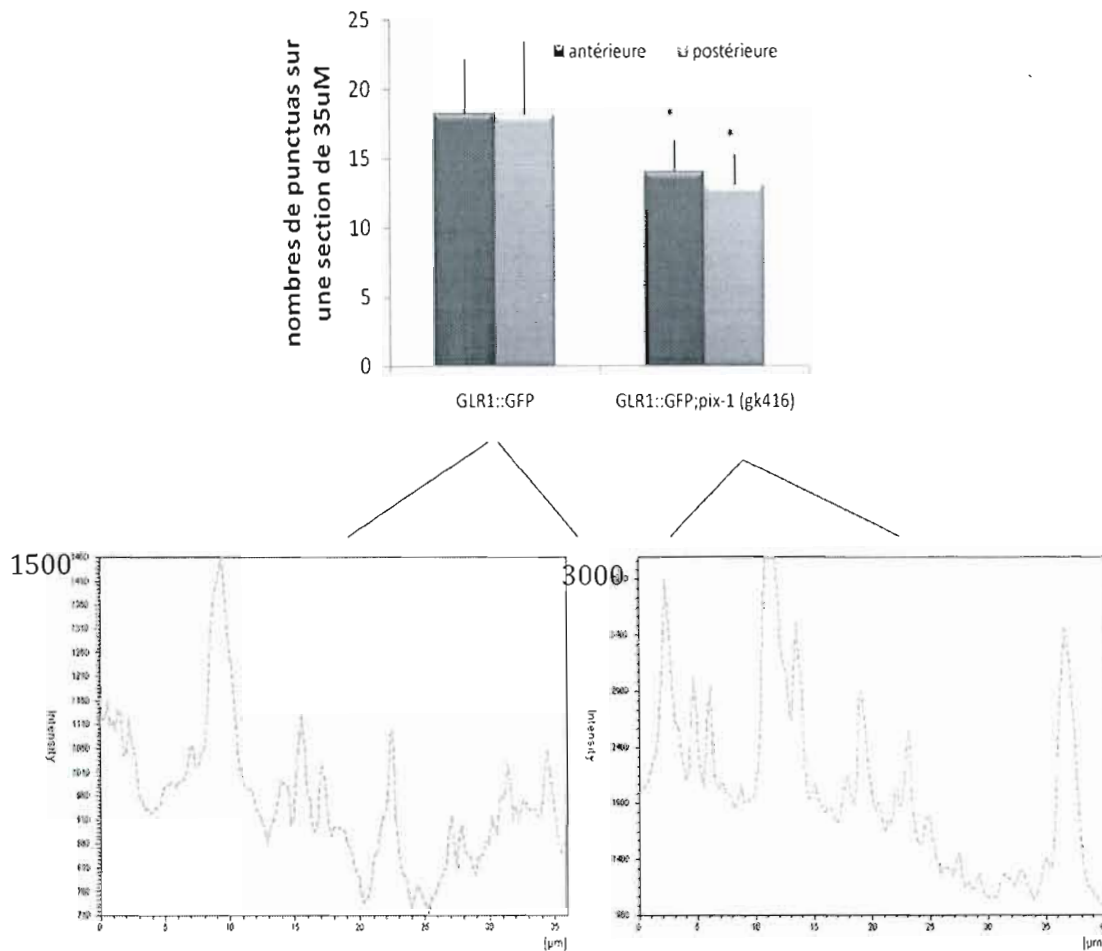


FIGURE 4-6: *pix-1(gk416)* A MOINS DE SYNAPSES EXPRIMANT GLR-1 ::GFP MAIS L'EXPRIME PLUS FORTEMENT. Le nombre de pontuas présents sur une section de 35µm est significativement inférieur dans les zones antérieure et postérieure à la vulve dans le contexte du mutant *pix-1 (gk416)*. Il faut noter que l'intensité de fluorecence des synapses exprimant GLR-1 ::GFP est par contre supérieure d'un facteur de 2, comparativement au contexte sauvage. Test de Student \* $p < 0.05$ ,  $n = 10$  vers/condition.

Ces données confirment que *pix-1* contrôle non seulement le comportement de forage, mais aussi l'accumulation de GLR-1 aux membranes post-synaptiques de certains moto-neurons et inter-neurons. Ainsi *pix-1* pourrait avoir une fonction inhibitrice pour le ciblage de GLR-1 aux membranes post-synaptiques ou encore favoriser son internalisation.

#### 4.2.3 PIX-1 NE COLOCALISE PAS AVEC GLR-1

Afin de savoir si la régulation de ces voies de signalisation s'effectue au niveau des domaines pré-synaptiques ou post-synaptiques, il fallait impérativement trouver si PIX-1 co-localisait avec le récepteur GLR-1. La génération du double transgénique PIX-1 ::mCherry; GLR-1 ::GFP a révélé que ces deux protéines n'étaient pas exprimées dans les mêmes neurones (Figure 4-7A). De plus, l'analyse de la localisation de ces deux protéines au niveau de la corde ventrale ne révèle aucune co-localisation des protéines PIX-1 et de GLR-1 (Figure 4-7B). Les résultats sous-entendent donc que *pix-1* jouerait un rôle sur la neurotransmission glutamatergique à distance.

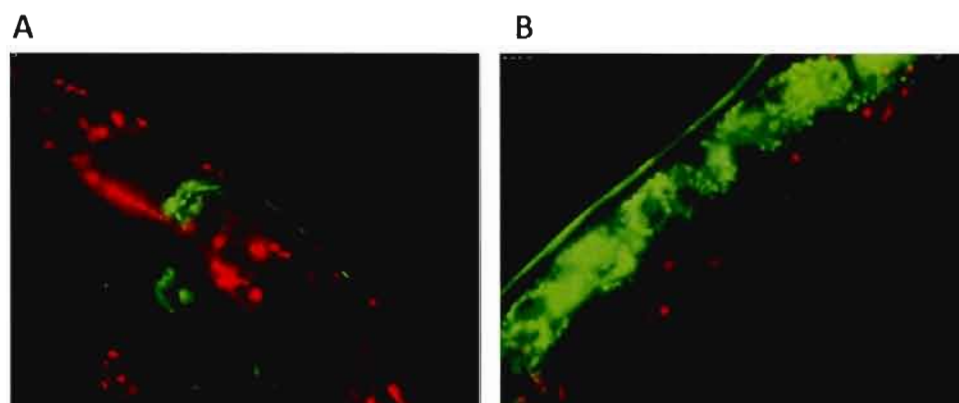


FIGURE 4-7 : PIX-1::MCHERRY ET GLR-1::GFP NE COLOCALISE PAS. L'expression de PIX-1 ::mCherry et GLR-1 ::GFP est mutuellement exclusive tant au niveau des neurones de la tête (A) qu'au niveau de la corde ventrale (B).

## CHAPITRE 5

### DISCUSSION

#### 5.1 PRINCIPALES CONCLUSIONS DE L'ÉTUDE

##### 5.1.1 *pix-1*, *git-1* ET *pak-1* CONTRÔLENT LA CONTRACTION DU PHARYNX

Nous avons mis en évidence que les mutations des gènes *pix-1*, *git-1* et *pak-1* induisent un trouble de contraction du pharynx, et que ce trouble est significativement aggravé suite au traitement des mutants avec un inhibiteur de MLCK et un inhibiteur de l'activité ATPasique de la Myosine II. Ces résultats nous amènent à considérer l'implication de *pix-1* et *pak-1* dans la régulation de l'activité de la Myosine II, et dans la régulation positive de l'activité des CLMr lors des contractions pharyngales. *git-1* participerait à ce processus, puisqu'il présente un phénotype significatif, mais son positionnement dans les voies de signalisation n'a pas été clairement mis en évidence vu la nature hypomorphique de l'allèle *ok1848*. *pix-1* se positionnerait en amont de la myosine II, et régulerait son activité positivement, directement ou en amont d'une kinase qui pourrait être *pak-1* ou une autre kinase (Figure 5-1A). Nos résultats indiquent la présence d'une voie parallèle, à l'axe *pix-1*, puisque l'allèle nul est significativement aggravé par le traitement avec les différents inhibiteurs de l'activité des CLMr (Figure 5-1). Nous avons mis en évidence la présence d'une MLCK, ou d'une protéine inhibée par ML-7 qui régulerait aussi positivement les contractions pharyngales (Figure 5-1). Il a été rapporté chez *C. elegans* que la contraction du pharynx dépend de l'intégrité des CLMr *mlc-1* et *mlc-2* (Rushforth, White et Anderson, 1998). De plus, les mutants *unc-89(e1460)* qui codent pour l'orthologue d'une MLCK, soit l'obscurin, présentent un trouble de contractions du pharynx (Avery, 1993) tout comme *pix-1*, *git-1* et *pak-1*. Par contre, *pix-1*, pourrait tout autant se situer strictement en parallèle, dans une voie de signalisation n'étant pas engagée dans la régulation de l'activité de la myosine II (Figure 5-1B).

Des mutations dans plusieurs gènes tel que de *mlc-1/2*, *unc-73* (GEF de Rac), *unc-89* (MLCK) conduisent à un trouble de contraction du pharynx et présentent un arrêt larvaire du à une sous-alimentation. Les larves sont viables, complètement allongées et aptent à semouvoir (Avery, 1993 ; Rushforth, White et Anderson, 1998 ; Steven *et al.*, 2005). Inversement les larves *pix-1*, *git-1* et *pak-1* sont paralysées, et sont partiellement allongées. Ce fait nous amène à croire que le trouble du pharynx ne traduit pas seulement l'implication de *pix-1*, *git-1* et *pak-1* dans le contrôle de la contraction du pharynx mais aussi leur implication dans un processus développemental. Ceci est supporté par le fait que les larves qui progressent au stade adulte ne présentent aucun défaut de contraction du pharynx. Il faut donc considérer la possibilité qu'un rôle de *pix-1*, *git-1* et *pak-1* durant le développement embryonnaire puisse perturber la structure du pharynx, ce qui rendrait la contraction de cet organe plus difficile chez les L1 non-allongées. À première vue, la structure de l'appareil digestif, suite à une immunohistochimie, semble intact au niveau des filaments intermédiaires (voir Figure3-5). Une étude plus précise de la structure du pharynx s'avérera nécessaire afin d'identifier la fonction de *pix-1*, *git-1* et *pak-1*. Il serait pertinent entre autre, d'évaluer l'intégrité de l'ACAM, il faudrait alors utiliser une approche d'immunohistochimie, en ciblant les composantes de l'ACAM. Il faudrait aussi étudier l'intégrité des membranes apicales/basolatérales, ainsi que, l'intégrité des jonctions adhérentes et des muscles du pharynx.

De plus, il ne faut pas négliger, que les mutants, présentaient non seulement une réduction de la contraction du pharynx, mais aussi une absence de rythmicité. Chez *C. elegans*, la contraction du pharynx, ainsi que la défécation et la contraction des gonades sont considérés comme des comportements rythmés (Avery et Thomas, 1997 ; McCarter *et al.*, 1997 ; Thomas, 1990). Nous avons d'ailleurs montré que les mutants *pix-1* (*gk416*) présentent des altérations pour d'autres comportements rythmés, tel qu'un taux de défécation réduit et une ponte altérée (voir Figure 4-1). Ces comportements, sont considéré non- neurogènes, puisque qu'ils sont observable malgré une perturbation de la fonction neuronale (Avery et Horvitz, 1989), et ils exigent des contractions, soit intestinales, pharyngales ou gonadales. Ces contractions sont synchronisées et dépendent de l'intégrité des jonctions communicantes, des flux de calcium et de la modulation des GPCRs (Avery et Horvitz, 1989 ; Dal Santo *et al.*,

1999 ; Lee *et al.*, 1997 ; Mahoney *et al.*, 2008 ; Norman *et al.*, 2005). Il a été montré chez *C. elegans*, que les GTPases Rhos, ainsi que la GEF VAV-1 jouent un rôle crucial dans la régulation de ces comportements rythmiques. La voie de signalisation de VAV-1, contrôlerait ces comportements rythmiques par la régulation du flux de calcium intracellulaire (Norman *et al.*, 2005). En fait, VAV-1 entraînerait l'activation des GTPases Rho/Rac (Rho-1, Mig-2 et Ced-10), en passant par l'activation de PLC- $\gamma$ , qui favorise la production d'IP<sub>3</sub>, qui entraînera l'ouverture des récepteurs IP<sub>3</sub>R et le largage de calcium du réticulum endoplasmique dans le milieu extracellulaire (Norman *et al.*, 2005). Tout comme *pix-1*, *git-1* et *pak-1*, les mutants *vav-1*, et *itr-1*, l'homologue d'IP<sub>3</sub>R, présentent une structure normale du pharynx, une réduction de contraction du pharynx, du taux de défécation, une ponte altérée et un arrêt larvaire (Kwan *et al.*, 2008 ; Norman *et al.*, 2005 ; Sonnichsen *et al.*, 2005 ; Walker *et al.*, 2002). Ainsi, l'altération du rythme de contraction, pourrait tout autant traduire l'implication de *pix-1*, *git-1* et *pak-1* dans des processus moléculaire, tel que le contrôle de la dynamique des flux de calcium ou des processus macro-moléculaire, tel que le trafic des récepteurs GPCRs. Des études chez les mammifères soutiennent vraisemblablement, un rôle pour PIX/GIT/PAK dans le contrôle des flux de calcium et le trafic de récepteurs. En effet, l'assemblage du complexe GIT-1/ $\beta$ -PIX avec PLC- $\gamma$ , serait nécessaire à la phosphorylation/activation de PLC- $\gamma$  lors de la migration cellulaire (Jones et Katan, 2007). L'activation de PLC- $\gamma$  induit alors une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium, dont dépendrait, l'activation de protéines calcium dépendantes, qui promeuvent la migration cellulaire, par l'activation de Rac-1 (Jones et Katan, 2007 ; Rosenberger, Gal et Kutsche, 2005). GIT-1 est aussi responsable de l'activation de PLC- $\gamma$  dans les cellules des muscles lisses, où il permet la mobilisation du calcium intracellulaire (Haendeler *et al.*, 2003). GIT-1 est aussi largement reconnu pour sa fonction dans le trafic de divers récepteurs, seul ou en complexe avec PIX, incluant les récepteurs de types GPCR tel que les récepteurs  $\beta$ -Adrenergique, Thyrotropine, FPR (Formyl-Peptide receptor) et EGFR (epidermal growth factor receptor) (Gavina *et al.* ; Haendeler *et al.*, 2003 ; Lahuna *et al.*, 2005 ; Premont *et al.*, 1998). PIX est aussi reconnu pour sa participation au trafic de récepteurs (voir section 1.3.8). Ainsi, l'aggravation des troubles de contractions du pharynx, suite aux traitements avec ML-7 et Blebbistatine, pourrait traduire l'altération de deux processus cellulaires différents (Figure 5-1).

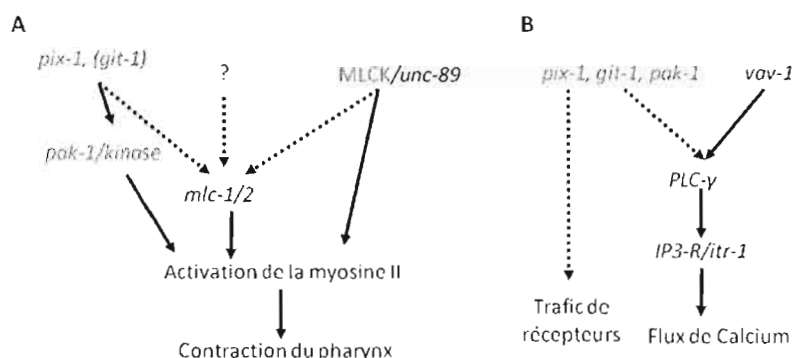


FIGURE 5-1: PIX-1, GIT-1 ET PAK-1 RÉGULE POSITIVEMENT L'ACTIVATION DE LA MYOSINE II ET LE RYTHME DES CONTRACTIONS DU PHARYNX. En noir sont représentés les gènes précédemment connus pour leur fonction régulatrice de la contraction du pharynx. En Bleu sont représentés les gènes identifiés lors de cette étude pour leur fonction régulatrice de la contraction du pharynx. Les flèches en pointillés représentent, une signalisation hypothétique/alternative. **A)** PIX-1/GIT-1/PAK-1 pourrait réguler les contractions du pharynx en contrôlant l'activité de la Myosine II, en parallèle avec une MLCK. **B)** Le rythme des contractions du pharynx est altéré chez les mutants *pix-1*, *git-1* et *pak-1*, ce phénotype pourrait traduire leur rôle dans le contrôle de la dynamique du flux de calcium intracellulaire ou leur rôle dans le trafic de récepteurs dont les GPCR.

### 5.1.2 *pix-1*, *git-1* ET *pak-1* SONT IMPLIQUÉS DANS L'ÉLONGATION PRÉCOCE

Nous avons démontré l'implication de *pix-1*, *git-1* et *pak-1* dans l'élongation précoce et nous avons réussi à positionner *pix-1* et *pak-1* dans les voies contrôlant ce processus. En effet, *pix-1*, *git-1* et *pak-1*, présentent tous une réduction du temps d'élongation entre le stade coma et plié 2 fois (Figure 3-10). Nous avons démontré qu'au cours de l'élongation précoce (entre le stade coma et plié 2 fois), *pix-1(gk416)* réduit la pénétrance du phénotype Emb induit par *mel-11(it26)* à 18°C. Nous en déduisons donc que *pix-1* a une fonction antagoniste à *mel-11*. *mel-11(it26)* n'étant pas considéré comme nul à 18°C nous ne pouvons dire si *pix-1* se situe en amont, en aval ou en parallèle de *mel-11*. En corrélation avec sa fonction antagoniste avec *mel-11*, *pix-1* a une fonction synergique à celle de *let-502*. Le mutant nul *pix-1(gk416)* aggrave le défaut d'élongation de *let-502ts* à 25.5°C, température à laquelle *let-502* est considéré comme nul. Ceci indique donc que *pix-1* serait en aval ou en parallèle de *let-502* au

cours de l'élongation précoce. Finalement, nos résultats montrent que 71% des animaux *mel-11 (it26)*, *let-502 (sb118ts)*; *pix-1 (gk416)* présentent des défauts d'élongation précoce par rapport à 100% observé dans *mel-11 (it26)*, *let-502 (sb118ts)*; *pak-1 (ok448)* (Gally *et al.*, 2009) ou *mel-11 (it26)*; *let-502 (sb118ts)*; *fem-2* (b245) (Piekny, Wissmann et Mains, 2000). Ces données suggèrent que *pix-1* contrôle l'élongation précoce de manière redondante avec un autre gène, possiblement en amont de *pak-1* et *fem-2*, alors que *pak-1* et *fem-2* fonctionnerait de manière non-redondante et fort probablement dans une même voie.

Nos analyses génétiques, montrent aussi que *pak-1* aggrave le phénotype Emb (arrêt au stade plié 1.5 fois), de *let-502* à 25.5°C, le faisant passer de 9% à 100%. Ces données indiquent que tout comme *pix-1*, *pak-1* contrôlerait l'élongation précoce, en parallèle ou en aval de *let-502*. Le triple mutant *pak-1(ok448)*; *mel-11 (it26)*; *let-502(sb118)* a été généré afin de confirmer le positionnement de *pak-1*. L'analyse génétique a montré, que *pak-1* abolit la suppression que les allèles *mel-11(it26)* et *let-502 (sb118)* exercent l'un sur l'autre, et le triple mutant présente une létalité embryonnaire de 100%, ce qui indique que PAK-1 se situe en parallèle de l'axe de signalisation MEL-11/LET-502.

Comme démontré précédemment, nous avons mis en évidence que le double mutant *mel-11 (it26)*; *pak-1 (ok448)* présente un phénotype similaire à *mel-11 (it-26)*: pratiquement 100% des embryons rupturent au cours de l'élongation. De manière surprenante *pak-1* n'est pas antagoniste à *mel-11* tel que nous aurions pu le supposer en assumant que *pak-1* puissent fonctionner avec *pix-1*. Ce résultat est une indication que *pix-1* et *pak-1* ne peuvent pas être impliqués dans une voie linéaire. PAK-1 a été montré pour promouvoir l'activation de MLC-4 en le phosphorylant directement et aussi pour être en parallèle de la voie LET-502/MEL-11 (Gally *et al.*, 2009), tout comme nos résultats l'ont aussi démontré. Comment expliquer alors qu'il ne supprime pas le phénotype d'hypercontraction de MEL-11. Dans cette étude de Gally (Gally *et al.*, 2009), les auteurs supposent que la capacité de phosphorylation de PAK-1, est moindre que la capacité de MEL-11 à déphosphoryler MLC-4. L'activité optimale de MLC-4 dépend de la phosphorylation de deux sites (T17/S18). Dans les faits, la phosphorylation d'un seul site permet une activité partielle de MLC-4. Il est alors possible que PAK-1 ne phosphoryle qu'un seul site de MLC-4 ce qui expliquerait son faible



pouvoir d'activation de MLC-4. En effet chez les mammifères PAK ne phosphorylent qu'un site sur les CLMr (Chew *et al.*, 1998). Considérant que la contribution de PAK-1 à la phosphorylation de MLC-4 est faible, il est possible d'expliquer pourquoi, l'absence de PAK-1 ne supprime pas le phénotype de MEL-11. Dans la mesure où l'axe de signalisation PIX-1/Cdc-42/MRCK serait présent dans la signalisation contrôlant l'élongation précoce, comme il l'est dans les processus de migration cellulaire chez les mammifères (Wilkinson, Paterson et Marshall, 2005), l'explication qui s'impose pour justifier, la suppression du phénotype de *mel-11*, par *pix-1* et non par *pak-1* est simple. En fait, si PIX-1 est en amont de MRCK-1 et de PAK-1, la délétion de PIX-1 inactiverait à la fois ces deux kinases, ce qui enlève simultanément un inhibiteur de *mel-11* et un antagoniste se situant en parallèle de la voie *mel-11/let-502* à l'inverse la mutation de *pak-1*, n'enlèverait que PAK-1 ce qui peut expliquer l'absence de suppression du phénotype de *mel-11*.

Puisque *pix-1* peut se positionner en parallèle ou en amont de *mel-11*, lors de l'élongation précoce, il faudrait vérifier l'hypothèse selon laquelle l'axe de signalisation de *pix-1* pourrait en effet activer la GTPase Cdc42. Nous n'avons pas été en mesure d'évaluer la fonction des GTPases durant l'élongation précoce puisque cette famille de protéine est largement impliquée dans une multitude d'événements cellulaires nécessaire au développement embryonnaire (Lundquist, 2006) et elles induisent toutes une létalité embryonnaire à des stades antérieurs à l'élongation. Chez les mammifères PIX active Cdc-42, qui par la suite active MRCK et cet axe de signalisation promeut la migration cellulaire (Wilkinson, Paterson et Marshall, 2005). Il a été démontré qu'au cours de l'élongation précoce MRCK inhibe l'activité de MEL-11 (Gally *et al.*, 2009). Il est par conséquent possible que chez le nématode l'activité antagoniste de *pix-1* sur *mel-11* se traduise via *mrck-1*. Cette hypothèse est valable, seulement si l'on considère que *pix-1* n'est pas strictement en amont de MRCK, mais qu'il puisse à la fois initier l'activation d'une seconde protéine ayant une fonction régulatrice positive sur l'activation de MLC-4 en parallèle de LET-502/MEL-11. Cette voie pourrait être l'axe PIX-1/PAK-1 qui est parallèle à la voie MEL-11/LET-502, tel que mentionné plus haut.

*git-1* présente le même phénotype que *pix-1* et *pak-1*, d'où nous considérons son implication dans l'élongation précoce. Nous savons que *git-1* a un rôle au cours de l'élongation précoce puisqu'il présente, une vitesse réduite de développement entre le stade coma et 2x (Figure 3-10). Son positionnement dans les voies de signalisation n'est pas résolu, mais nous le positionnons en considérant qu'il fonctionne en complexe avec *pix-1*, jusqu'à preuve du contraire. En effet, il a été montré dans une multitude de processus, que l'intégrité du complexe GIT/PIX est nécessaire à l'activation de PAK et autres effecteurs de ces voies (Stockton *et al.*, 2007). L'approche utilisée pour positionner *pix-1* et *pak-1* devrait être répétée avec un allèle nul de *git-1* afin de confirmer le rôle de ce dernier dans le processus d'élongation.

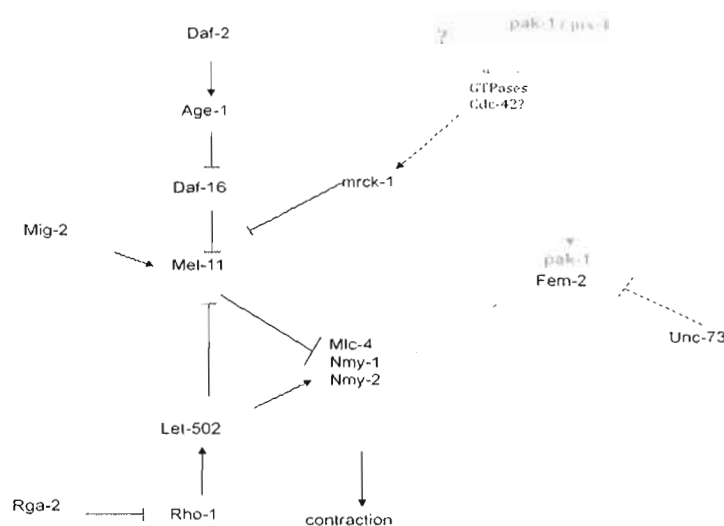


FIGURE 5-2 : VOIE DE SIGNALISATION CONTRÔLANT L'ÉLONGATION PRÉCOCE. Nous avons réussi à positionner PIX-1/GIT-1/PAK-1 dans les voies conduisant au contrôle de la phosphorylation et déphosphorylation des CLMr durant l'élongation précoce. En noir sont représentés les voies connues. En bleu sont représentées nos contributions à l'élucidation de ces voies. Les flèches en pointillées indiquent des positionnements hypothétiques ou extrapolés d'études faites chez les mammifères.

### 5.1.3 *pix-1*, *git-1*, *pak-1*, *mel-11* CONTRÔLENT L'ÉLONGATION TARDIVE PAR LA RÉGULATION DE L'ACTIVITÉ DES CLMR ET DE LA MYOSINE II

Nous avons largement contribué à l'élucidation de la signalisation contribuant à l'élongation tardive (Figure 5-3). Nos efforts se sont concentrés sur la caractérisation de l'élongation tardive, puisque ce processus restait à ce jour le moins bien défini. Nous avons réussi à démontrer que *pix-1*, *git-1* et *pak-1* sont des régulateurs de la machinerie de phosphorylation des CLMr durant l'élongation tardive et nous avons confirmé l'implication de la Myosine II à cette étape développementale par l'utilisation d'inhibiteurs de divers régulateurs de l'état de phosphorylation des CLMr. Nous avons aussi mis en évidence pour la première fois le rôle de *mel-11* dans le contrôle de l'élongation tardive et ce en redondance avec une autre protéine.

L'élongation précoce et tardive, nécessitent un contrôle de la contractilité de l'ACAM, mais aussi son ancrage au niveau des jonctions serrées au pôle apicale des cellules de l'hypoderme, ainsi que la transmission de la force contractile au niveau de l'actine circonférentielle. L'hyper-contraction de l'ACAM, conduit habituellement à une rupture des embryons (qui s'exprime par une létalité embryonnaire), alors que l'hypo-contraction de l'ACAM conduit à un arrêt larvaire et des larves non allongées. Il s'avèrerait que *pix-1*, *git-1* et *pak-1* exhibent, un phénotype consistant avec une hypo-contraction. En effet, le ralentissement de la vitesse d'élongation observé par microscopie dynamique 4D, pour *pix-1*, *git-1* et *pak-1* entre le stade plié 2 fois et 3 fois, traduit fort probablement, un trouble d'hypo-contractions (Figure 3-10). Nous avons mis en évidence une fonction de régulateurs positifs de l'activité des CLMr et de la Myosine II, pour *pix-1*, *git-1* et *pak-1* en utilisant une série d'inhibiteur contre des régulateurs de ces activités.

Le traitement à la Blebbistatine a induit chez *pix-1*, *git-1* et *pak-1* une aggravation synergique du phénotype NaLv. Ce résultat met en évidence le rôle de PIX/GIT/PAK dans la régulation positive de la contraction de l'ACAM au cours de l'élongation tardive. Ces données suggèrent en fait que la myosine II pourrait être impliquée dans le contrôle de l'élongation tardive et que PIX-1, PAK-1 et GIT-1 fonctionneraient dans une voie promouvant la fonction

de la myosine II. PIX-1, GIT-1 et PAK-1 fonctionnerait en amont de la myosine II ou en parallèle à d'autres voies conduisant à son activation et à la contraction de l'ACAM.

En utilisant la Calyculin A pour obtenir une réduction de fonction partielle de *mel-11*, nous avons réussi à mettre en évidence sa fonction dans l'élongation tardive. Il a été observé que les mutants *pix-1*, *git-1* et *pak-1* suppriment le phénotype de NaLv induit par la Calyculin A. Les embryons *mel-11 (it26)* qui échappent au phénotype de rupture au cours de l'élongation précoce se développent normalement jusqu'au stade adulte (Piekny, Wissmann et Mains, 2000). À l'inverse, les nématodes traités à la Calyculin A expriment un arrêt larvaire de type *pix-1* caractéristique d'un défaut d'élongation tardive. Cette observation supporte l'hypothèse selon laquelle MEL-11 pourrait réguler l'activité de MLC-4 de façon redondante avec au moins une autre phosphatase, au cours de l'élongation tardive. Nous émettons donc l'hypothèse que MEL-11 puisse être redondant avec une protéine inhibée elle aussi par la Calyculin A et contrôlant l'étape d'élongation tardive. FEM-2 est une phosphatase, présentant un phénotype similaire à *pix-1* de larves non allongées et le même antagonisme par rapport à MEL-11 (Piekny, Wissmann et Mains, 2000), par contre FEM-2 étant une phosphatase de la famille PP2C, il est peu probable que ce soit cette dernière qui ait été inhibée par la Calyculin A, puisque cet inhibiteur est spécifique aux phosphatases PP-1 et PP2A et n'a pas d'effet sur les phosphatases PP2C. En effet, les domaines catalytiques des phosphatases PP2C ne partagent que peu d'homologie avec ceux des phosphatases de la famille PP-1 et PP2A (Denu *et al.*, 1996 ; Shenolikar, 1994). Ces données supposent donc l'implication d'une troisième phosphatase à ce jour non identifiée dans le processus d'élongation.

Par l'utilisation de ML-7, un inhibiteur de MLCK, nous avons démontré la présence potentielle d'une MLCK qui fonctionnerait en parallèle de *pix-1*, *git-1* et *pak-1* au cours de l'élongation tardive. L'hypothèse de la présence d'un homologue de MLCK a été proposée à deux reprises auparavant (Gally *et al.*, 2009 ; Piekny et Mains, 2003). Nous avons mis en évidence la présence d'une MLCK, sans toutefois l'identifier. Le plus proche homologue de MLCK (ZC373.4) a été vérifié et n'est pas impliqué dans le processus d'élongation tardive (Gally *et al.*, 2009). Il existe plusieurs homologues de MLCK chez *C. elegans*, mais à ce jour

aucun n'a été identifié pour sa fonction dans le processus d'élongation. Nous proposons éventuellement de toutes les tester. Les joueurs moléculaires identifiés jusqu'à maintenant, pour leur participation au contrôle de l'activité de la Myosine II dans le processus d'élongation chez le nématode, sont très représentatifs des protéines identifiées, chez les mammifères pour leur fonction régulatrice de la myosine dans des processus tel la migration cellulaire. Chez les mammifères, les CLMr sont phosphorylés/activée par ROCK (LET-502), PAK (Chew *et al.*, 1998), MRCK, MLCK et inhibé par PKC. De plus PAK phosphoryle et active les CLMr, alors qu'il inactive MLCK. Les CLMr sont aussi inhibées par l'activité phosphatase de MLCP. L'activité de MLCP est en revanche régulé négativement par ROCK (Kimura *et al.*, 1996), MRCK (Muranyi *et al.*, 2001) et PAK (Takizawa, Koga et Ikebe, 2002) entre autre. Ces informations ainsi que les résultats d'interaction génétique avec ML-7 permettent de spéculer qu'une MLCK s'intègre effectivement dans les voies de signalisation contrôlant l'élongation chez le nématode. Ces mécanismes de signalisation sont très complexes et inter-reliés et laissent croire que la régulation de l'activité des CLMr par ces régulateurs est contrôlée de manière spatio-temporelle.

Les résultats obtenus par ces analyses chimio-génétique ont d'ailleurs été confirmé avec les doubles et triples mutants. Les analyses génétiques, ont montrés que 55% des embryons *mel-11 (it26); let-502 (sb118ts); pix-1 (gk416)* ayant dépassé le stade précoce de l'élongation ont arrêté leur élongation à un stade d'élongation tardif. Ces données suggèrent une implication de *pix-1* à un stade tardif de l'élongation. De plus, le phénotype de NaLv caractéristique des mutants de *pix-1*, *git-1* et *pak-1* est augmenté de 9% (dans les mutants *pix-1 (gk416)*) à 55% chez les mutants *mel-11 (it26); let-502 (sb118ts); pix-1 (gk416)* à 25,5 ° C (Table 3-3). Ces résultats démontrent pour la première fois un rôle pour *mel-11* et *let-502* au cours de l'élongation tardive et ce en parallèle de *pix-1*.

La forte pénétrance des troubles d'élongation précoce dans les animaux *pak-1(ok448); mel-11 (it-26); let-502 (sb118)* ont rendu impossible la confirmation des résultats chimio-génétique par l'approche de génétique classique, afin d'élucider le rôle de *pak-1* au cours de l'élongation plus tardive

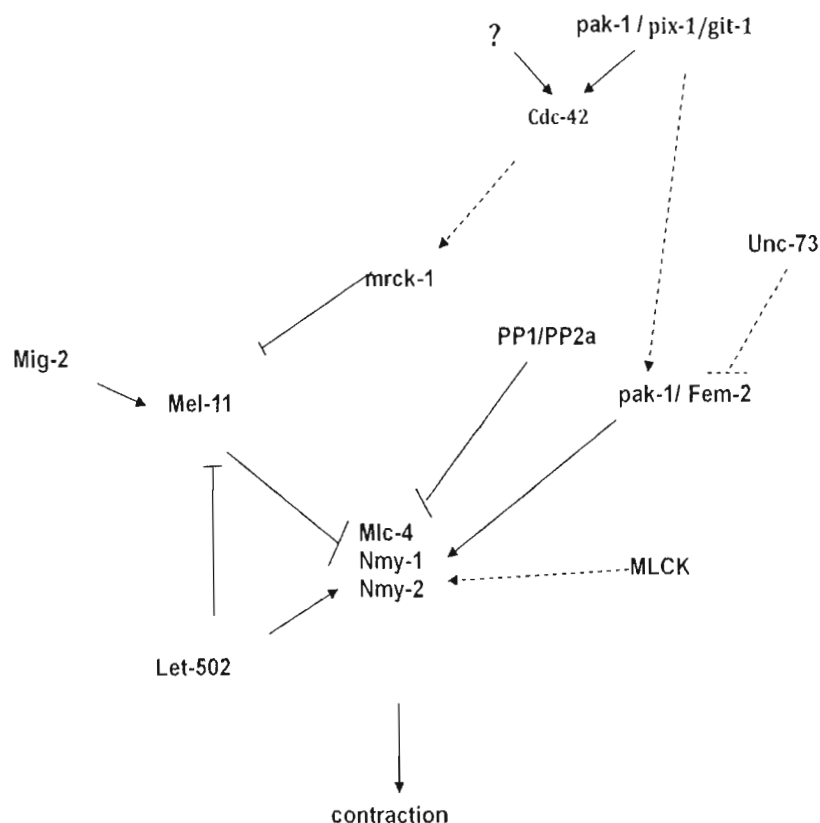


FIGURE 5-3 : VOIES RÉGULANT L'ACTIVITÉ DES CLMR ET DE LA MYOSINE II AU COURS DE L'ÉLONGATION TARDIVE. Sont représentées les conclusions tirées de cette étude. En pointillée sont des positionnements hypothétique, extrapoler des études mammifères ou incertain.

#### 5.1.4 LES GTPASES RHOS CONTRÔLENT L'ÉLONGATION TARDIVE

Nous avons identifié les GTPases Cdc-42, Rac-2, Ced-10, Crp-1 et Mig-2 comme participant au processus d'élongation tardive. En effet nos données d'ARNi confirment une synergie entre Cdc42, et *pix-1*, *git-1* et *pak-1* (voir Figure 3-11 et 3-12). *pix-1*, *git-1* et *pak-1* se positionneraient en amont ou en parallèle de cette GTPase. Les résultats ARNi confirment aussi l'hypothèse selon laquelle *mig-2* et *ced-10* seraient antagonistes à Cdc-42 au cours du processus d'élongation tardive. En effet les résultats obtenus suite aux traitements ARNi contre les GTPases Rhos, montrent que *ced-10* est antagoniste à *pak-1*, et que *mig-2*, est

antagoniste à *pix-1*, *git-1* et *pak-1* (Figure 3-12). Ce résultat confirme que *mig-2* fonctionne dans une voie parallèle et antagoniste à l'axe *pix-1/pak-1/git-1* (Figure 5-4). L'antagonisme fonctionnel entre *mig-2* et *pix-1*, *git-1* et *pak-1* n'étonne pas, puisque *mig-2* a été identifié comme régulant l'élongation en activant *mel-11* (Wissmann, Ingles et Mains, 1999). Nos résultats sont d'ailleurs soutenus par d'autres études qui ont mis en évidence que MIG-2 permet l'activation de MEL-11 et que CED-10 est antagoniste à PAK-1 (Pedone *et al.*, 2008 ; Piekny, Wissmann et Mains, 2000).

Le positionnement de *pix-1*, *git-1* et *pak-1* par rapport à *cdc-42* est compliqué. Premièrement, le positionnement de *git-1*, par rapport à *cdc-42*, n'a pas été confirmé, vue la nature de l'allèle hypomorphe de *git-1*. Encore une fois, il sera considéré, que GIT-1, se positionne avec PIX-1, comme chez les mammifères, leur interaction moléculaire est nécessaire à leur fonction. *pix-1(gk416)* et *pak-1(ok448)* étant des allèles nuls et *cdc-42(ARNi)* pouvant être considéré comme un allèle hypomorphe, nos résultats suggèrent que *cdc-42* fonctionnerait en aval ou en parallèle de *pix-1* et *pak-1* durant le processus d'élongation tardive. Considérant les activités catalytiques de *pix-1* et *pak-1* et les mécanismes d'activation de ces protéines chez les mammifères nous pouvons interpréter nos résultats de trois manières différentes.

1. Le dimère *pix-1/pak-1* activerait *cdc-42*. Il a été montré chez les mammifères que l'association de PAK avec PIX favorise l'activité GEF de PIX envers CDC-42 (Baird, Feng et Cerione, 2005 ; Feng, Baird et Cerione, 2004). Ce premier cas de figure corrèlerait avec l'interaction synergique entre *pak-1* et *cdc-42*, en supposant que l'association de *pix-1* et *pak-1* est nécessaire à l'activité GEF de *pix-1* envers *cdc-42* (Figure 5-4A)
2. L'altération de toutes composantes se trouvant strictement en amont de *pak-1*, ne devrait pas causer d'altération du phénotype (ni augmentation, ni réduction), puisque l'allèle est nul. Puisque *pak-1* est synergique avec *cdc-42*, nos résultats indiquent que *pak-1* n'est pas uniquement activé par *cdc-42*. *pak-1* peut être activée par une autre GTPase que *cdc-42*. Cette GTPase selon nos données ne pourrait être que Rac-2. Rac-2 qui ne modifie pas le phénotype de l'allèle *pak-1* (Figure 3-11), alors qu'il présente une additivité avec les allèles de *git-1(ok1848)*, *pix-1(gk416)* (Figure 3-



- 12). Il est possible de postuler que le complexe PAK/PIX, favoriserait l'activité GEF de PIX envers Cdc-42. Ensuite le complexe Cdc-42/PIX, favoriserait l'activité GEF de PIX envers Rac, tel qu'il a été démontré chez les mammifères (Feng *et al.*, 2002 ; Feng, Baird et Cerione, 2004)(Figure 5-4B).
3. *pak-1* pourrait aussi être activée par *pix-1* de manière GTPases-indépendante tel que démontré chez le nématode au cours de l'élongation des gonades (Lucanic et Cheng, 2008) et chez les mammifères dans la régulation des adhésions focales (Brown, West et Turner, 2002) et être strictement en parallèle de *cdc-42* (Figure 5-4C). Cependant, Il ne faut pas négliger la possibilité de la présence simultanée d'une voie GTPases-dépendantes et d'un voies GTPases-indépendante, conduisant à l'activation de PAK-1, tel que montré pour l'élongation des gonades.

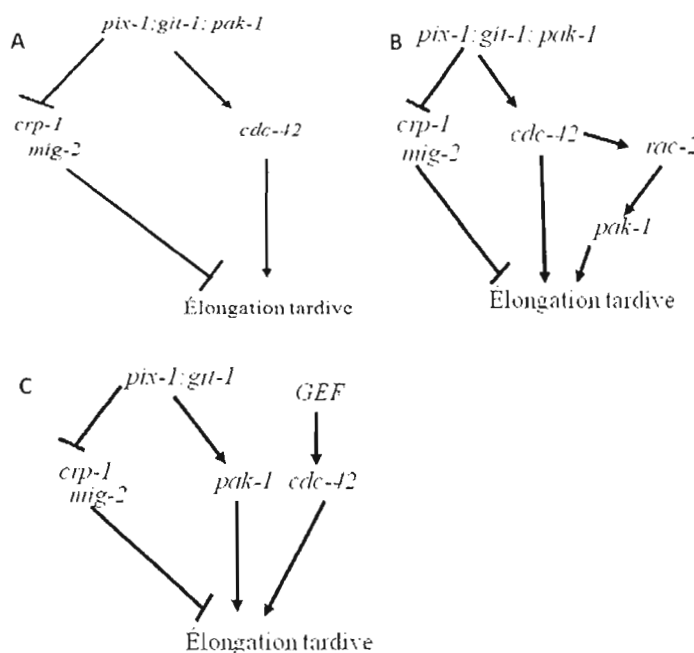


FIGURE 5-4 : RÉSUMÉ DES INTERACTIONS AVEC LES GTPASES RHOS :A) *pix-1*, *git-1* et *pak-1* ont une fonction antagoniste à *crp-1* et *mig-2* et se situent en amont de *cdc-42*. B) *pak-1* est l'effecteur de *rac-2*, et est activé par une cascade *pix-1/cdc-42*). C) *pak-1* est activé par *pix-1/git-1* de manière GTPase indépendante et se situe en parallèle de *cdc-42*.

Selon les résultats obtenus suite au traitement ARNi contre les GTPases Rhos, *ced-10* serait une GTPase fonctionnant en parallèle et de façon antagoniste à *pak-1* (Figure 5-5 B) ou qui serait en aval et inhibée par *pak-1* au cours de l'élongation (Figure 5-5A).

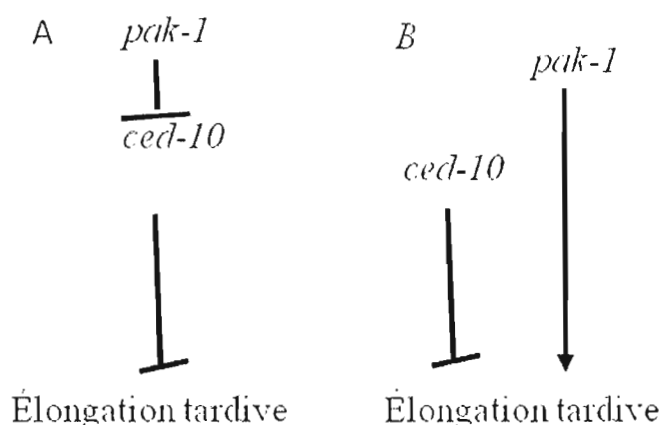


FIGURE 5-5: L'ANTAGONISME DE *pak-1* ET *ced-10*. **A)** *pak-1* se positionne en amont de *ced-10* et l'inhibe **B)** *pak-1* et *ced-10* ont une fonction antagoniste sur l'élongation tardive et ils se positionnent dans des voies de signalisation parallèle.

En ce qui concerne *crp-1*, il semble avoir une fonction antagoniste à *pix-1*, *pak-1* et *git-1*, voir *cdc-42*. Il fonctionne soit en aval de *pix-1*, *pak-1* et *git-1* ou encore dans une voie parallèle à celle de *pix-1*, *pak-1* et *git-1*. Dans ces deux cas, l'effecteur de *crp-1*, doit avoir une fonction antagoniste à l'axe de signalisation *pix-1*, *pak-1* et *git-1*. Sachant que *crp-1* est responsable du trafic membranaire apical et est exprimé au niveau de cellule de type épithéliale (Jenna *et al.*, 2005), il est possible qu'il régule le trafic des composantes des jonctions adhérentes qu'on retrouve à la face apicale des cellules. Il est important de noter ici que *crp-1* n'a pas été détecté dans les cellules de l'hypoderme dans les nématodes transgéniques (Jenna *et al.*, 2005). Or ceci n'exclut pas la possibilité que cette protéine puisse être exprimée dans ces cellules à un niveau très faible. En effet, les données SAGE montrent que CRP-1 est exprimé dans les cellules de l'hypoderme et dans l'embryon. Il a été montré que CRP-1 n'altère pas la localisation d'AJM-1 dans les cellules de l'intestin chez l'animal adulte. Cette protéine est une composante des jonctions apicales nécessaire à l'élongation de l'embryon. CRP-1 n'affecte pas la localisation d'AJM-1 dans les cellules épithéliales de l'intestin, mais pourrait affecter sa localisation dans les cellules hypodermiques ou encore affecter la localisation

d'autres molécules composant ou participant à la formation/intégrité des jonctions apicales dans les cellules hypodermiques.

#### 5.1.5 LES GTPASES ARFS CONTRÔLENT L'ÉLONGATION TARDIVE

Les GTPases ARFs chez *C. elegans*, contrôlent la morphogénèse, l'organisation des microtubules et le développement des cilia (Lundquist, 2006). Nous avons montré leur fonction dans un processus morphogénique durant le développement embryonnaire. Nos résultats démontrent l'implication des GTPases Arfs dans le processus d'élongation tardive. Nous avons montré que les traitements avec les ARNi contre Arl-3, Arl-5 et Arf-6, suppriment les phénotypes de *pix-1*, *git-1* et *pak-1*. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que *git-1* puisse être une GAP pour ces GTPases. L'homologue mammifère de GIT-1 a aussi une activité GAP envers Arf-6 *in vivo*. Il semblerait qu'Arf-6 module les contacts cellules-cellules via les complexes cadhérines, en participant au ciblage des cadhérines (Palacios *et al.*, 2001). L'ARNi contre *evl-20*, un paralogue d'*arl-5*, a été rapporté pour induire non seulement un trouble d'élongation précoce, soit au stade haricot et au stade plié 1.2-1.5 fois, mais encore, les larves qui échappent à l'arrêt d'élongation, présentent elles-mêmes une élongation incomplète et des défauts morphologiques similaires à ceux présentés pour les larves *pix-1*, *pak-1* et *git-1* (Antoshechkin et Han, 2002). Ces défauts morphogéniques et développementaux induit par l'ARNi contre *elv-20* n'ont pas été associés avec une altération des jonctions apicales, ni à une altération des complexes Cadhérine/Caténine, mais ils ont été corrélés avec une perturbation de l'orientation circonférentielle des microtubules (Antoshechkin et Han, 2002). Les microtubules, tous comme l'ACAM, sont nécessaires pour une élongation correcte de l'embryon (Priess et Hirsh, 1986). Lors de l'élongation tardive, l'intégrité des structures d'attachements (jonctions apicales et complexe Cadhérines/Caténines) est nécessaire à l'élongation, tout comme le réarrangement des structures du cytosquelette que l'on retrouve dans les cellules hypodermiques ventrales et dorsales est essentielle à l'élongation (Priess et Hirsh, 1986). Les structures formées de microtubules au niveau des cellules hypodermiques ventrales et dorsales, servent à distribuer la force de contraction générée par l'ACAM au niveau des cellules latérales. Ainsi nos résultats mettent en lumière un rôle pour les GTPases Arfs dans le processus d'élongation

tardive, même s'il faut encore résoudre leurs mécanismes fonctionnels dans ce processus. Les GTPases Arfs sont d'abord connus pour leur fonction dans le trafic membranaire. Ainsi la fonction GTPases Arfs dans le processus d'élongation, pourrait être liée à un rôle dans le trafic de composantes membranaires, nécessaire à l'intégrité de l'hypoderme.

#### 5.1.6 PAK-1, PAK-2 ET MAX-2 CONTRÔLENT L'ÉLONGATION TARDIVE

Par la suite nous avons tenté de mettre en évidence une redondance fonctionnelle entre les 3 homologues de PAK, soit PAK-1, PAK-2 et MAX-2, au cours de l'élongation tardive, comme il avait été démontré pour l'élongation des gonades (Lucanic et Cheng, 2008). Nous avons montrés que les mutants *max-2* et *pak-2*, ne présentent pas les phénotypes Emb et NaLv. De plus les résultats, obtenus par l'utilisation d'inhibiteurs des régulateurs de l'activité de la myosine, ne montrent aucune aggravation du phénotype NaLv. Ces résultats portent à croire que *max-2* et *pak-2* ne participent pas au processus d'élongation et qu'ils ne partagent pas de redondance fonctionnelle avec *pak-1*. Ces résultats ne prouvent pas hors de tout doute que *max-2* et/ou *pak-2* ne soient pas redondant avec *pak-1* au cours de l'élongation. Considérant le niveau élevée de redondance déjà connu dans la régulation de ce processus, il aurait peut-être été nécessaire d'altérer plus de deux composantes de ces voies afin de pouvoir observer une interaction synergique ou synthétique. L'allèle *pak-1(ok448)* pourrait hypothétiquement, avoir une fonction de dominant négatif. C'est-à-dire que l'allèle de *pak-1(ok448)*, possède son domaine d'interactions avec les GTPases et PIX alors qu'il a perdu son activité kinase. Il est possible que la protéine codée par *pak-1(ok448)* séquestre, la/les GTPases avec la/lesquelles il interagit et donc empêche *max-2* et *pak-2* d'interagir avec ces GTPases. L'étude des interactions génétiques de *pak-1*, *pak-2* et *max-2* est donc essentielle afin de savoir si ces protéines sont redondantes aux cours de l'élongation embryonnaire. Afin de mettre leur rôle en évidence, il aurait été nécessaire de générer un triple mutant et les doubles mutants. Il a été montré que le double mutant de *pak-1(ok448);pak-2(ok332)* montrent des défauts embryonnaires et une létalité larvaire en L1 non observés chez l'un ou l'autre des simples mutants (Lucanic *et al.*, 2006). Cette étude souligne la redondance potentielle entre *pak-1* et *pak-2*.

Nous avons réussi par l'utilisation des traitements ARNi contre les GTPases, à mettre en évidence une potentielle redondance entre *pak-2* et *pak-1*. En effet, l'ARNi contre *ced-10*, montre une interaction antagoniste avec *pak-2* et *pak-1* alors qu'il a une interaction synergique avec *max-2* (Figure 3-13). Ces résultats indiquent que *pak-2* puissent avoir une redondance fonctionnelle avec *pak-1* lors de l'élongation tardive, alors que *ced-10/max-2*, forment un axe de signalisation parallèle et antagoniste à l'axe comprenant *pak-1/pak-2* (Figure 5-6). Dans ce cas de figure, il est important de mentionner que l'aggravation du phénotype de *max-2*, un allèle nul, par l'ARNi contre *ced-10* indique que *max-2*, se situe soit en amont soit en parallèle de *ced-10*. Cette hypothèse doit être étoffée, mais il a déjà été mis en évidence dans la littérature que *pak-1* était redondant avec *pak-2* lors d'une étape d'embryogénèse (Lucanic *et al.*, 2006). De plus *max-2* serait l'effecteur de *ced-10*, durant une étape d'élongation (Pedone *et al.*, 2008). En considérant nos résultats, *max-2*, pourrait être l'effecteur de *ced-10*, seulement s'il fonctionne en parallèle avec un second effecteur de *ced-10*. Globalement nos résultats vont dans la même direction que ces études.

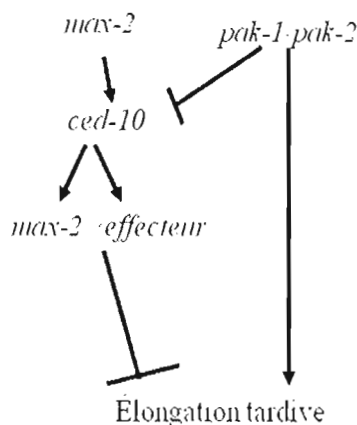


FIGURE 5-6 : PAK-1/2 SONT REDONDANTS ET ANTAGONISTES À MAX-2/CED-10. *max-2* peut se positionner en parallèle ou en amont de *ced-10*, alors que *pak-2* semble avoir une fonction redondante à *pak-1* par rapport à *ced-10*. En combinant nos résultats avec les données de la littérature, *max-2*, peut être l'effecteur de *ced-10*, en redondance avec un second effecteur.

### 5.1.7 PIX-1 N'EST PAS REDONDANT AVEC TIAM-1 LORS DE L'ÉLONGATION TARDIVE

Nous avons mis en évidence que lors de l'élongation tardive, *pix-1*, fonctionnerait fort probablement en parallèle d'une autre GEF. Nous avons testé si Tiam-1 était redondant avec PIX-1. Tiam-1 n'est pas redondant avec PIX-1 pour l'élongation d'après nos résultats d'interaction chimio-génétique qui montrent que *tiam-1(ok772)* aggrave le phénotype d'élongation du traitement à la calyculin A. Donc, il présenterait un phénotype similaire à *unc-73* qui aggrave le phénotype de MEL-11, lors de l'élongation précoce. Ainsi *tiam-1* pourrait avoir une redondance avec *unc-73*. Il serait intéressant d'investiguer si *tiam-1* serait redondant avec *unc-73* pour l'élongation tardive et éventuellement vérifier si ceci peut s'appliquer aussi à l'élongation précoce. Il faut considérer que l'expérience avec la Calyculin A a été effectuée sur un nombre de vers limité. Il semble que la mutation de *tiam-1*, puisse avoir le potentiel d'aggraver le phénotype induit par *mel-11*, mais ce résultat doit être reconfirmé. Nos résultats semblent indiquer que *tiam-1*, une GEF de Rac, puisse en fait être redondante avec *unc-73*, durant l'élongation tardive. Afin d'étoffer cette hypothèse, les doubles mutants devront être générés.

### 5.1.8 INA-1 SIGNALE VIA PIX-1, GIT-1 ET PAK-1 LORS DE L'ÉLONGATION TARDIVE

Nous avons mis en évidence au cours du processus d'élongation tardive qu'INA-1 signale vers PIX-1/GIT-1/PAK-1. En effet nos résultats d'interactions génétiques ont montré que l'ARNi contre *ina-1*, aggrave le phénotype NaLv, des mutants hypomorphes *pix-1 (ok982)* et *git (ok1848)*, alors qu'il n'aggrave pas les allèles nuls *pix-1 (gk416)* et *pak-1 (ok448)*. Chez le nématode, il a été montré que *pix-1*, *git-1* et *pak-1* réguleraient l'élongation des gonades au cours du développement larvaire en aval des intégrines *ina-1* (Lucanic et Cheng, 2008). Il semblerait donc que ce module de signalisation soit conservé dans ces deux processus de morphogénèse. L'allèle *gml44* d'*ina-1* induit un arrêt larvaire en L1, similaire à celui observé chez *pix-1*. Chez *C. elegans*, *ina-1* code pour une intégrine alpha interagissant avec PAT-3, une intégrine Beta. Ensembles, elles régulent la migration cellulaire et des processus de morphogénèse. INA-1 agit comme un récepteur pour la laminine, une composante de la



matrice extracellulaire des membranes basales. D'ailleurs, *ina-1*, est responsable en partie, de l'intégrité de la membrane basale du pharynx (Trzebiatowska *et al.*, 2008). Chez les mammifères le complexe PIX/GIT/PAK a été montré comme jouant un rôle majeur dans la régulation de la mobilité des complexes d'adhésion focaux comportant les intégrines (Zhao *et al.*, 2000). Les intégrines sont responsable de la communication avec la matrice extracellulaire, elles régulent aussi la signalisation intracellulaire et plus récemment, elles sont supposées pour leur implication dans la communication cellules-cellules et pour s'intégrer dans les complexes cadhérines (Geiger *et al.*, 1992 ; Genda *et al.*, 2000). Nos résultats devront être confirmés en générant les différentes combinaisons de double mutants. Les intégrines contribuent à la plupart, sinon à la totalité, des événements morphogénétiques qui forme un organisme en développement (Gumbiner, 1996), d'où l'importance de caractériser les voies de signalisation dans lesquelles elles sont impliquées.

#### 5.1.9 GIT-1 ET PAK-1 ONT UNE FONCTION INDÉPENDANTE DE PIX-1 LORS DE L'ÉLONGATION TARDIVE

Dans le processus de régulation de la dynamique des complexes d'adhésion focaux chez les mammifères, PIX/GIT/PAK favorise la dynamique d'assemblage et de désassemblage des complexes focaux (Zhao *et al.*, 2000). Paxillin et acto-paxin joueraient aussi un rôle important dans ces mécanismes (Nikolopoulos et Turner, 2000). Chez les nématodes, *pxl-1* et *pat-6* sont tous deux impliqués dans l'attachement de l'actine et de la myosine au corps dense. Le traitement des mutants *pxl-1* à l'ARNi contre *pak-1*, induit une réduction du phénotype de *pxl-1*, alors que le traitement avec l'ARNi contre *git-1*, réduit le phénotype de *pat-6* (Figure 3-13). Ces résultats indiquent un antagonisme fonctionnel entre *git-1/pat-6* et *pak-1/pxl-1*. De plus ces résultats suggèrent une fonction pour *git-1* et *pak-1* dans les mécanismes permettant un attachement approprié des cellules musculaires aux cellules de l'hypoderme et/ou une transduction adéquate des signaux mécaniques provenant de la contraction des muscles et permettant l'élongation tardive des embryons. Les mutants PAT présentent des défauts d'adhérence des cellules musculaires du corps aux cellules de l'hypoderme ce qui altère grandement l'élongation tardive qui est largement dirigée par la contraction des muscles. Il est intéressant de voir que seule la réduction de l'expression de *git-1* est capable de réduire ces défauts. Ceci implique que *git-1* pourrait avoir des fonctions



au cours de l'élongation qui soient indépendantes de *pix-1* et *pak-1*. De même seul l'ARNi contre *pak-1* est capable de supprimer les défauts d'élongation liés à la mutation de *pxl-1*. Ceci indique que *pak-1* aurait lui aussi des fonctions indépendantes de *pix-1* et *git-1*.

On se rapellera que les corps denses sont l'équivalent des adhésions focales mammifères. La formation des corps dense nécessite l'assemblage de complexes moléculaires, qui permettent de relier l'hypoderme, la membrane basale, les muscles et les complexes contractiles (actine/myosine). Ces complexes sont formés des intégrines, dont PAT-3 et de l'acto-paxine et paxillin qui présentent le phénotype PAT (Paralysed arrested elongation). Le phénotype PAT est un phénotype d'arrêt larvaire, causé par un trouble d'élongation tardive. En fait le phénotype PAT, résulte de défauts musculaires, que ce soit leur attachement à la membrane basale, ou leur contractilité. Les mutants de certaines composantes de la signalisation/flux du calcium, dont les canaux calciques de type L, (*egl-19*) présentent chez le nématode, la panoplie de phénotypes rythmiques (voir section 5.1.1), en plus de présenter le phénotype PAT (Lee *et al.*, 1997), soit un trouble d'élongation tardive. Chez les mammifères, les GTPases RhoA, Rac1 et Cdc42, sont toutes trois impliquées dans le contrôle de l'activité des canaux calciques de types L et voltage dépendant (Wilk-Blaszczak *et al.*, 1997 ; Yatani *et al.*, 2005). Nous avons soulevé précédemment (voir 5.1.1), l'hypothèse selon laquelle, PIX/GIT/PAK, puissent être impliqué dans la signalisation calcique. Cette hypothèse persiste au fil des analyses, et semble s'appliquer à la majorité des phénotypes recensés lors de cette étude et devra ultimement être vérifiée, malgré la possibilité qu'ils s'agissent de deux processus indépendants, mais nécessaires au maintien des rythmes et de l'élongation.

Le rôle de *pix-1*, *git-1* et *pak-1* dans l'élongation semble être extrêmement complexe et impliquer de nombreux processus contrôlant la contraction des FACs, le trafic des membranes, la réorganisation des cytosquelettes d'actine et des microtubules, l'assemblage des complexes d'adhérence cellules/cellules et la dynamique d'assemblage des complexes d'adhésion focaux. Ces mécanismes semblent de plus impliqués la grande majorité des GTPases Rho et Arfs. Ce qui souligne le rôle de plateforme de signalisation déjà décrit dans de nombreux systèmes pour le complexe PIX/GIT/PAK.

### 5.1.8 PIX-1 RÉGULE NÉGATIVEMENT LA SIGNALISATION GLUTAMATERGIQUE DE MANIÈRE INDIRECTE

Nous avons réussi à démontrer que *pix-1* a une fonction neuronale. En effet les animaux *pix-1 (gk416)* présentent des altérations comportementales tel qu'un taux de ponte réduit, un taux de défécation réduit, une augmentation de l'oscillation de la tête. Ces phénotypes corréleront fortement avec les phénotypes observés chez des mutants de la signalisation dopaminergique, mais aussi glutamatergique.

Nous avons montré que *pix-1* régule le comportement de recherche de nourriture et la capacité des nématodes à naviguer en environnement complexe. Les animaux *pix-1(gk416)* présentent, une fréquence de reculons accrue en absence de nourriture et n'arrivent pas à naviguer en environnement complexe. La fréquence de reculons des nématodes en absence de nourriture et la navigation en environnement complexe sont contrôlés par un réseau de neurones glutaminergiques et dopaminergiques. Une altération de la sécrétion de ces neurotransmetteurs ou la mutation de leurs récepteurs entraînent une diminution de la fréquence de reculons. Ces données, suggèrent que la mutation *pix-1(gk416)* augmenterait la signalisation dopaminergique et/ou glutamatergique au niveau d'un certain nombre de neurones contrôlant la fréquence de reculons.

Nous avons confirmé que *pix-1 (gk416)* avait pour effet d'augmenter l'adressage des récepteurs au glutamate GLR-1 aux membranes post-synaptiques de certains neurones. Ces résultats suggèrent que PIX-1 régulerait négativement le ciblage de ces récepteurs à la membrane post-synaptiques ou encore, qu'il régulerait positivement leur endocytose. PIX-1 pourrait recruter via son domaine SH3 et moduler la fonction de diverses ubiquitine ligases qui participent à la régulation négative de la signalisation des récepteurs au glutamate (Janz, Sakmar et Min, 2007 ; Jozic *et al.*, 2005). Son interaction avec les ubiquitine ligases, perturberait ainsi la régulation négative (dégradation) de ces dernières sur les récepteurs. Cette fonction de PIX-1, pourrait expliquer que malgré une accumulation aux membranes post-synaptiques de GLR-1::GFP, le niveau d'expression de ce récepteur est réduit dans le contexte *pix-1 (gk416)*. Par contre, lorsque nous avons vérifié si PIX-1::mCherry et GLR-

1::GFP était exprimé dans les même cellules, nous avons constaté qu'ils étaient mutuellement exclusifs et donc, il était impossible que PIX-1 puisse réguler le trafic ou la dégradation de GLR-1::GFP directement. Il est peu probable que PIX-1 ::mCherry soit exprimé dans les mauvaises neurones, puisque la construction utilisée pour générer les nématodes transgéniques contient toutes les régions régulatrices se situant 30kpb autour du locus de *pix-1*.

Les mutants *pix-1(gk416)*, qui ont un taux de défécation et de ponte réduit et un mouvement oscillatoire de la tête augmenté et un taux de reculons augmenté présentent un profil phénotypique similaire à un état d'hyperdopaminergie. En effet les nématodes *wt* exposés à des sources exogènes de dopamine présentent eux aussi ce profil phénotypique, alors que les mutants *dop-1/2* perte de fonction présentent les phénotypes inverses. De plus, il a déjà été démontré que l'altération de la neurotransmission glutamatergique et dopaminergique a des conséquences sur le comportement exploratoire ainsi que la capacité des nématodes à naviguer dans un environnement complexe (Brockie *et al.*, 2001 ; Hills, Brockie et Maricq, 2004 ; Qin et Wheeler, 2007). La régulation de la fréquence de reculons et celle de la navigation en environnement complexe implique l'activation de récepteurs NMR-1 et DOP-1/2 que l'on suppose contrôlent l'adressage du récepteur au glutamate GLR-1 aux membranes post-synaptiques de certains neurones. Nos résultats sont en accord avec l'hypothèse selon laquelle *pix-1* régulerait ces comportements en contrôlant la sécrétion de la dopamine au niveau des neurones dopaminergiques et que les mutants nul de *pix-1* entraîneraient un état d'hyperdopaminergie. Cette hypothèse devra être confirmée par une approche génétique et par la confirmation de l'expression de PIX-1 dans les neurones dopaminergiques. Il a récemment été montré qu'une hyperdopaminergie chez les souris peut entraîner des troubles importants de l'adaptation aux changements environnementaux (Morice *et al.*, 2007). Il n'est donc pas exclu que les troubles comportementaux observés chez les souris mutantes pour PIX soient due à une altération de la signalisation dopaminergique.

*pak-1* n'a pas été caractérisé et devra l'être. En ce qui concerne *git-1*, il n'a pas été complètement caractérisé, mais il présente tout comme *pix-1 (gk416)* et les mutants *nmr-1* et *glr-1*, une navigation altérée dans les environnements complexes. Il est fort probable qu'il soit

aussi impliqué dans la signalisation glutamatergique, comme PIX-1, et son homologue mammifère GIT-1 (Ko *et al.*, 2003). D'ailleurs, le prédicteur d'interactions génétiques généré par notre groupe, prédit l'interaction entre *git-1*, *pix-1* et *syd-2* (Lee *et al.*, 2010). SYD-2 est l'homologue de Liprin $\alpha$ . C'est par son interaction avec la Liprin $\alpha$ , que chez les mammifères, GIT-1 est impliqué dans le ciblage des récepteurs AMPAR (Ko *et al.*, 2003).

L'étude du potentiel rôle de *pix-1* dans la neurotransmission à un intérêt important afin de mieux comprendre l'origine moléculaire des troubles comportementaux et cognitifs associés aux mutations dans le gène codant pour  $\alpha$ -PIX chez l'homme et la souris, malgré les avancées faites dans ces organismes. Le modèle animal *C. elegans*, permettra une disséction plus rapide des mécanismes pathologiques résultants de l'altération de *pix-1*.

Dans la perspective, où PIX-1::mCherry ne serait pas exprimée dans des neurones dopaminergique il serait intéressant d'évaluer quantitativement avec une méthode analytique, la présence des divers neurotransmetteurs de la transmission glutamatergique, dopaminergique, sérotonergique et cholinergique, afin d'identifier précisément, le rôle de PIX-1 dans l'altération de l'adressage de GLR-1::GFP. Il ne faudrait pas négliger l'avenue des comportements rythmiques. En effet, les phénotypes de défécation, de pontes et de contraction pharyngale, pourrait aussi résulter d'une altération des flux de calcium, ou de l'internalisation de certains récepteurs tels les GPCRs.

## 5.2 LIMITES DE L'ÉTUDE

### 5.2.1 L'ÉTUDE DE L'EXPRESSION DE PIX-1::mCHERRY

Les constructions de protéines fluorescentes en fusion transcriptionnelle ou traductionnelle peuvent fournir une indication rapide quant à l'expression des gènes et l'expression et la distribution des protéines, ces méthodes présentent des limitations (Mello et Fire, 1995). Nous avons généré un vers transgénique exprimant PIX-1::mCherry en fusion traductionnelle, et le profil d'expression sub-cellulaire de PIX-1 pourrait être affecté par la sur-expression due à la présence de multiple copie de la construction du fosmide modifiés, mais encore par la présence de mCherry, qui peut altérer la distribution de PIX-1. La distribution sub-cellulaire

réelle de la protéine PIX-1 devrait être vérifiée et confirmée par l'utilisation d'anticorps spécifique. Il reste tout de même que le profil d'expression de PIX-1 devrait être étudié de manière plus détaillée, afin de confirmer si PIX-1 est exprimé au cytosol, s'il se rattache aux membranes (plasmique ou des organelles), sa localisation apicale et/ou basolatérale, ainsi que sa distribution cellulaire précise. Pour se faire, l'utilisation de la microscopie confocale s'impose, ainsi que la génération de nématode transgénique, exprimant PIX-1::mCherry sous le contrôle d'un promoteur restreignant son expression dans divers types cellulaires. Ces observations, permettront de mieux cerner le rôle de PIX-1 au niveau moléculaire et cellulaire et ainsi expliciter l'origine des phénotypes.

### 5.2.2 CONFIRMATION DE LA FONCTION DE *pix-1*

Nous aurions dû effectuer une expérience de sauvetage, afin de confirmer que les phénotypes observés chez *pix-1 (gk416)* étaient bel et bien la cause d'une perte de fonction de *pix-1*. En croisant le mutant avec le vers transgénique exprimant PIX-1::mCherry, nous aurions pu vérifier si l'expression de la protéine fonctionnelle chez les mutants *pix-1 (gk416)* permettait de supprimer le phénotype de ce dernier. Les souches ont tout de même été croisées à 3 reprises avec des vers *wt* afin de s'assurer d'éliminer toute autre mutation aléatoires pouvant causer les phénotypes observés. De plus nous sommes confortés par l'observation du même phénotype caractéristique chez le mutant nul *pix-1 (gk416)* et le mutant hypomorphe *pix-1 (ok982)*.

### 5.2.3 EXTRAPOLATION DES RÉSULTATS AUX ORGANISMES SUPÉRIEURS

L'idée derrière la caractérisation fonctionnelle de *pix-1*, *git-1* et *pak-1* chez le nématode, est de développer un modèle afin de faciliter la dissection des voies de signalisation dans lesquelles est impliquée la plate-forme de signalisation PIX/GIT/PAK. Le but à long terme serait de pouvoir utiliser les données et les informations obtenues chez le nématode afin de les extrapoler aux organismes supérieurs en vue, par exemple d'identifier des cibles thérapeutiques sur le modèle animal, mais aussi afin de mieux comprendre la régulation des



GTPases Rho et ARFs par la plateforme de signalisation PIX/GIT/PAK. Évidemment il est aussi possible d'obtenir ces informations d'études directes sur des organismes mammifères. L'avantage du modèle nématode est son adaptabilité aux méthodes de criblage haut-débit et le fait de pouvoir observer les mécanismes de signalisation dans un contexte multicellulaire. La question, est de savoir si l'extrapolation aux organismes supérieurs est possible et fiable.

Plusieurs arguent que la conservation des GTPases monomériques à travers les phylas sont garants de leur fonction essentielle dans des processus fondamentaux eux aussi conservé à travers les phylas. La réalité est que la duplication génique et la divergence sont la source de l'expansion de la famille des GTPases (Wherlock et Mellor, 2002). Certaines GTPases sont effectivement conservées, mais elles co-existent avec des GTPases ayant divergées afin de combler une fonction particulière et spécialisée, qu'on ne retrouve pas d'un organisme à l'autre. Cette divergence peut introduire ou éliminer, selon le cas des partenaires moléculaires nécessaire à un processus particulier, qui n'est pas nécessairement récapitulé dans un autre organisme (supérieur ou inférieur). Pour certain, ce limite l'interprétation et l'extrapolation faite d'un organisme à un autre. Par exemple, même si *mig-2* est une Rac, présente chez le *C. elegans* et la *Drosophile* elle n'a pas d'équivalent dans le génome humain. À l'inverse une Rac (RhoBTB) présente chez le *Dictyostelium* et la *Drosophile*, et l'homme est totalement absente du génome de *C. elegans*. Ainsi l'identification de partenaires/régulateurs/effecteurs interagissant avec Mig-2 chez le nématode ne pourront pas nécessairement être extrapolés chez l'homme, et inversement pour RhoBTB. Il est vrai que la prudence s'impose dans l'analyse des voies de signalisation dite fondamentale, mais la vérité est que *C. elegans* a été utilisé avec succès pour identifier des mécanismes moléculaires et pathologiques et même pour la caractérisation de voies de signalisation fondamentales inconnues dans les organismes supérieures et l'identification de cibles thérapeutiques. Par exemple, c'est grâce à *C. elegans* que la complexité de la coordination de la voie de signalisation Ras/MAPK a été résolue (Eisenmann *et al.*, 1998 ; Gleason, Korswagen et Eisenmann, 2002 ; Moghal et Sternberg, 2003 ; Simske et Kim, 1995) . De plus, *C. elegans* a largement contribué à d'importantes percées dans le domaine biomédicale. En effet, grâce à l'utilisation de cet organisme, il a été possible, d'identifier la prenesilin, responsable de la maladie d'alzheimer et ce 2ans avant qu'elle soit identifiée chez l'homme (Levitan et

Greenwald, 1995 ; Sundaram et Greenwald, 1993). Un régulateur négatif de la signalisation à l'insuline a été découvert 5 ans avant qu'il soit identifié chez la souris pour supprimer le phénotype pathologique de souris diabétique (Nakae *et al.*, 2002 ; Ogg *et al.*, 1997). Le nématode est aussi utilisé pour l'identification de cible thérapeutique, et il s'est avéré très efficace pour le développement de thérapies pour des pathologies humaines, d'ailleurs l'utilisation de *C. elegans* dans cette perspective a fait l'objet d'une revue (Kaletta et Hengartner, 2006). À la lumière de ces caractéristiques, il en ressort un réel potentiel pour cet organisme modèle.

#### 5.2.4 ÉTUDE DE LA REDONDANCE FONCTIONNELLE

Pour l'élucidation de la redondance fonctionnelle entre deux protéines qu'il s'agisse de TIAM-1 et PIX-1 ou de PAK-1 et PAK-2/MAX-2, afin d'éliminer toute incertitude, les doubles mutants devraient être générés. L'approche choisie, où nous observons quantitativement un phénotype dans des conditions identiques (traitement avec inhibiteur ou ARNi), donne un indice sur cette possible redondance fonctionnelle, mais ne permet pas avec certitude d'infirmier ou de confirmer nos hypothèses. Par contre ceci permet de donner une direction rapide. Par exemple si TIAM-1 était possiblement redondant avec PIX-1 il aurait présenté un profil phénotypique similaire, cela n'étant pas le cas, nous pouvons dès lors diriger les efforts vers d'autres protéines et comme présenté, vérifier une redondance entre TIAM-1 et UNC-73.

#### 5.2.4 INTERACTION GÉNÉTIQUES AVEC LES GTPASES

Le traitement ARNi par alimentation utilisé, n'est pas parfaitement adapté pour mettre en évidence le rôle des GTPases dans le processus d'élongation. Cette technique ne permet pas de prendre en compte le rôle cellulaire du gène altéré ni de cibler une étape spécifique du développement embryonnaire. Les GTPases sont reconnus pour être exprimées de façon ubiquitaire et impliquée à de nombreuses étapes du développement. L'étude du rôle de cette famille de protéine nécessite donc le développement d'une approche permettant l'expression



de mutants dans le domaine GTPasique (qui ne soient ni des dominants négatifs, ni des mutants constitutivement actifs) sous le contrôle d'un système d'expression transcriptionnel et post-transcriptionnel inductible. Cette approche, combinée à l'ARNi cellule spécifique pourrait permettre de caractériser les liens fonctionnels des différentes GTPases Rho contrôlant les étapes précoces et tardives de l'élongation.

### 5.3 PERSPECTIVES DE RECHERCHES

#### 5.3.1 APPROFONDISSEMENT DE LA CARACTÉRISATION

Nous avons réussi à faire une ébauche des voies de signalisation régulant le processus d'élongation tardive. L'utilisation du modèle animal *C. elegans*, nous a permis de cartographier *in vivo* et dans un organisme multicellulaire, des réseaux de signalisation impliqués dans des événements morphogéniques complexes et coordonnées par plusieurs GTPases Rhos et Arfs. Cette approche a permis, de confirmer des réseaux de signalisation précédemment caractérisés dans d'autres organismes, et de mettre en évidence de nouvelles voies de signalisation chez le nématode. Certains positionnements sont convaincants, d'autres ont besoin d'être étoffés. Il serait important de positionner PIX-1, GIT-1 et PAK-1 les uns par rapport aux autres en générant les différentes combinaisons de double mutants et le triple mutant et caractériser l'origine moléculaire de la pléiotropie de ces gènes. Il faudra aussi confirmer que PIX-1, GIT-1 et PAK-1 fonctionnent réellement en complexe chez le nématode. Pour ce faire une méthode *in vitro* pourra être utilisée, dans laquelle les protéines du nématode seraient exprimées en cellules mammifères et co-immunoprécipitées. Cette confirmation devrait aussi être obtenue *in vivo*, il serait intéressant d'adapter et considérer l'utilisation de la méthode SPINE (Herzberg *et al.*, 2007). Avec la méthode SPINE, une protéine marquée avec un Strep-Tag, par exemple GIT-1, est exprimée dans le système d'intérêt; dans ce cas-ci, *C. elegans*, où elle pourra interagir avec ses partenaires, par exemple PIX-1. L'addition de formaldéhyde (fixation des nématodes) permet de lier la protéine avec son/ses partenaires *in vivo*. Le complexe formé peut être isolé par une chromatographie d'affinité, et les partenaires interagissant avec la protéine marquée peuvent être libérés et

analysé par SDS-PAGE. Il faudrait pour ce faire, générer des nématodes transgéniques sur-exprimant la protéine avec le Strep-Tag.

De plus nous avons mis en évidence diverses interactions avec des GTPases Arfs et Rhos. Il serait important de confirmer les activités catalytiques de PIX-1 et GIT-1 envers chacune d'elles afin de valider les positionnements élucidés à partir de l'approche génétique. Lorsque ces confirmations auront été obtenues, les voies de signalisation identifiées seront mieux caractérisées, ce qui permettra d'accroître notre compréhension sur la coordination des machineries de signalisation des GTPases

### 5.3.2 UN MODÈLE POUR L'IDENTIFICATION DE MÉCANISMES MOLÉCULAIRES ET DE CIBLE THÉRAPEUTIQUE

Nous avons initié la caractérisation d'un modèle nématode pour la pathologie du RM, lié à des mutations d' $\alpha$ -PIX/*pix-1*. L'élucidation de la fonction neurologique de *pix-1* reste partielle. Plusieurs points doivent être confirmés, dont sa localisation neuronale, les mécanismes moléculaires par lesquels cette GEF régule l'adressage du récepteur GLR-1 et son rôle dans la formation des synapses tel qu'observé chez les mammifères. Notre groupe a développé un outil permettant une prédiction d'interaction génétique (Lee *et al.*, 2010). Cet outil pourrait s'avérer utile à l'établissement de ce modèle pathologique, puisqu'il devrait permettre d'identifier les mécanismes moléculaires liés à l'altération de *pix-1* et ce plus rapidement qu'avec une approche aléatoire. Nous avons aussi entamé le développement de méthodes haut débit pour la quantification des phénotypes afin d'effectuer des criblages haut-débit de drogues pouvant supprimer les phénotypes pathologiques liés à la mutation de *pix-1*. Le trouble de contraction du pharynx pourrait être évalué en mettant les vers en présence de billes fluorescentes de la taille d'une bactérie et la fluorescence serait mesurée avec le COPAS biosort. Une méthode similaire a été utilisée avec succès pour quantifier le comportement alimentaire du nématode (Boyd, McBride et Freedman, 2007). Les troubles comportementaux pourront être évalués dans des labyrinthes microfluidiques secs.

## 5.4 CONCLUSIONS

Nous avons élucidé la fonction de *pix-1* chez le nématode et mis en évidence son rôle ainsi que celui de *git-1* et *pak-1* dans le processus d'élongation embryonnaire. Nous avons confirmé une conservation fonctionnelle de *pix-1*, *git-1* et *pak-1* chez le nématode, tant pour leur rôles dans les processus de migration et de morphogenèse cellulaire que dans les processus neuronaux, tel que la régulation de l'adressage de certain récepteurs aux membranes post-synaptiques. Cette étude a permis de constater le rôle capital des GTPases Rhos et Arfs ainsi que de leurs régulateurs dans les événements morphogéniques lors du développement embryonnaire du nématode. De plus, la mise en évidence, d'une fonction neuronale pour *pix-1* nous amènent à croire que ce modèle animal pourrait être utilisé pour étudier les mécanismes pathologiques associés aux mutations dans ces gènes, ainsi que pour des criblages haut-débit avec des drogues visant des cibles thérapeutique potentielles.

## RÉFÉRENCES

- Ahnert-Hilger, G., M. Holtje, G. Grosse, G. Pickert, C. Mucke, B. Nixdorf-Bergweiler, P. Boquet, F. Hofmann et I. Just. 2004. «Differential effects of Rho GTPases on axonal and dendritic development in hippocampal neurones». *J Neurochem*, vol. 90, no 1, p. 9-18.
- Allen, K. M., J. G. Gleeson, S. Bagrodia, M. W. Partington, J. C. MacMillan, R. A. Cerione, J. C. Mulley et C. A. Walsh. 1998. «PAK3 mutation in nonsyndromic X-linked mental retardation». *Nat Genet*, vol. 20, no 1, p. 25-30.
- Antoshechkin, I., et M. Han. 2002. «The *C. elegans* *evl-20* gene is a homolog of the small GTPase ARL2 and regulates cytoskeleton dynamics during cytokinesis and morphogenesis». *Dev Cell*, vol. 2, no 5, p. 579-591.
- Arias-Romero, L. E., et J. Chernoff. 2008. «A tale of two Paks». *Biol Cell*, vol. 100, no 2, p. 97-108. En ligne.
- Armstrong, D., J. K. Dunn, B. Antalffy et R. Trivedi. 1995. «Selective dendritic alterations in the cortex of Rett syndrome». *J Neuropathol Exp Neurol*, vol. 54, no 2, p. 195-201.
- Ashburner, M., C. A. Ball, J. A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J. M. Cherry, A. P. Davis, K. Dolinski, S. S. Dwight, J. T. Eppig, M. A. Harris, D. P. Hill, L. Issel-Tarver, A. Kasarskis, S. Lewis, J. C. Matese, J. E. Richardson, M. Ringwald, G. M. Rubin et G. Sherlock. 2000. «Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium». *Nat Genet*, vol. 25, no 1, p. 25-29.
- Audebert, S., C. Navarro, C. Nourry, S. Chasserot-Golaz, P. Lecine, Y. Bellaiche, J. L. Dupont, R. T. Premont, C. Sempere, J. M. Strub, A. Van Dorsselaer, N. Vitale et J. P. Borg. 2004. «Mammalian Scribble forms a tight complex with the betaPIX exchange factor». *Curr Biol*, vol. 14, no 11, p. 987-995..
- Avery, L. 1993. «The genetics of feeding in *Caenorhabditis elegans*». *Genetics*, vol. 133, no 4, p. 897-917..
- Avery, L., et H. R. Horvitz. 1989. «Pharyngeal pumping continues after laser killing of the pharyngeal nervous system of *C. elegans*». *Neuron*, vol. 3, no 4, p. 473-485. En ligne.
- Avery, L., et J.H. Thomas (1997). Feeding and defecation. *C.elegans II*. D. L. Riddle, T. Blumenthal, B.J. Meyer et J.R. Preiss. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 619-716 p

- Bachner, D., Z. Sedlacek, B. Korn, H. Hameister et A. Poustka. 1995. «Expression patterns of two human genes coding for different rab GDP-dissociation inhibitors (GDIs), extremely conserved proteins involved in cellular transport». *Hum Mol Genet*, vol. 4, no 4, p. 701-708.
- Bagrodia, S., D. Bailey, Z. Lenard, M. Hart, J. L. Guan, R. T. Premont, S. J. Taylor et R. A. Cerione. 1999. «A tyrosine-phosphorylated protein that binds to an important regulatory region on the cool family of p21-activated kinase-binding proteins». *J Biol Chem*, vol. 274, no 32, p. 22393-22400.
- Bagrodia, S., S. J. Taylor, C. L. Creasy, J. Chernoff et R. A. Cerione. 1995. «Identification of a mouse p21Cdc42/Rac activated kinase». *J Biol Chem*, vol. 270, no 39, p. 22731-22737.
- Baird, D., Q. Feng et R. A. Cerione. 2005. «The Cool-2/ $\alpha$ -Pix protein mediates a Cdc42-Rac signaling cascade». *Curr Biol*, vol. 15, no 1, p. 1-10.
- Barbe, L., E. Lundberg, P. Oksvold, A. Stenius, E. Lewin, E. Bjorling, A. Asplund, F. Ponten, H. Brismar, M. Uhlen et H. Andersson-Svahn. 2008. «Toward a confocal subcellular atlas of the human proteome». *Mol Cell Proteomics*, vol. 7, no 3, p. 499-508..
- Baron, M. K., T. M. Boeckers, B. Vaida, S. Faham, M. Gingery, M. R. Sawaya, D. Salyer, E. D. Gundelfinger et J. U. Bowie. 2006. «An architectural framework that may lie at the core of the postsynaptic density». *Science*, vol. 311, no 5760, p. 531-535.
- Bienvenu, T., V. des Portes, N. McDonell, A. Carrie, R. Zemni, P. Couvert, H. H. Ropers, C. Moraine, H. van Bokhoven, J. P. Fryns, K. Allen, C. A. Walsh, J. Boue, A. Kahn, J. Chelly et C. Beldjord. 2000. «Missense mutation in PAK3, R67C, causes X-linked nonspecific mental retardation». *Am J Med Genet*, vol. 93, no 4, p. 294-298. En ligne.
- Bilder, D., et N. Perrimon. 2000. «Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble». *Nature*, vol. 403, no 6770, p. 676-680.
- Billuart, P., T. Bienvenu, N. Ronce, V. des Portes, M. C. Vinet, R. Zemni, H. Roest Crolius, A. Carrie, F. Fauchereau, M. Cherry, S. Briault, B. Hamel, J. P. Fryns, C. Beldjord, A. Kahn, C. Moraine et J. Chelly. 1998. «Oligophrenin-1 encodes a rhoGAP protein involved in X-linked mental retardation». *Nature*, vol. 392, no 6679, p. 923-926.
- Blanpied, T. A., et M. D. Ehlers. 2004. «Microanatomy of dendritic spines: emerging principles of synaptic pathology in psychiatric and neurological disease». *Biol Psychiatry*, vol. 55, no 12, p. 1121-1127.

- Boda, B., I. Nikonenko, S. Alberi et D. Muller. 2006. «Central nervous system functions of PAK protein family: from spine morphogenesis to mental retardation». *Mol Neurobiol*, vol. 34, no 1, p. 67-80.
- Boeckers, T. M. 2006. «The postsynaptic density». *Cell Tissue Res*, vol. 326, no 2, p. 409-422.
- Bokoch, G. M. 2003. «Biology of the p21-activated kinases». *Annu Rev Biochem*, vol. 72, p. 743-781..
- Bokoch, G. M., B. P. Bohl et T. H. Chuang. 1994. «Guanine nucleotide exchange regulates membrane translocation of Rac/Rho GTP-binding proteins». *J Biol Chem*, vol. 269, no 50, p. 31674-31679.
- Bourgin, C., K. K. Murai, M. Richter et E. B. Pasquale. 2007. «The EphA4 receptor regulates dendritic spine remodeling by affecting beta1-integrin signaling pathways». *J Cell Biol*, vol. 178, no 7, p. 1295-1307.
- Boyd, Windy A., Sandra J. McBride et Jonathan H. Freedman. 2007. «Effects of Genetic Mutations and Chemical Exposures on *Caenorhabditis elegans* Feeding: Evaluation of a Novel, High-Throughput Screening Assay». *PLoS One*, vol. 2, no 12, p. e1259.
- Bredt, D. S., et R. A. Nicoll. 2003. «AMPA receptor trafficking at excitatory synapses». *Neuron*, vol. 40, no 2, p. 361-379.
- Brockie, P. J., et A. V. Maricq. 2006. «Ionotropic glutamate receptors: genetics, behavior and electrophysiology». *WormBook*, p. 1-16.
- Brockie, P. J., J. E. Mellem, T. Hills, D. M. Madsen et A. V. Maricq. 2001. «The *C. elegans* glutamate receptor subunit NMR-1 is required for slow NMDA-activated currents that regulate reversal frequency during locomotion». *Neuron*, vol. 31, no 4, p. 617-630.
- Brown, M. C., K. A. West et C. E. Turner. 2002. «Paxillin-dependent paxillin kinase linker and p21-activated kinase localization to focal adhesions involves a multistep activation pathway». *Mol Biol Cell*, vol. 13, no 5, p. 1550-1565.
- Burbea, M., L. Dreier, J. S. Dittman, M. E. Grunwald et J. M. Kaplan. 2002. «Ubiquitin and AP180 regulate the abundance of GLR-1 glutamate receptors at postsynaptic elements in *C. elegans*». *Neuron*, vol. 35, no 1, p. 107-120.
- Caruso, M. E., S. Jenna, S. Beaulne, E. H. Lee, A. Bergeron, C. Chauve, P. Roby, J. F. Rual, D. E. Hill, M. Vidal, R. Bosse et E. Chevet. 2005. «Biochemical clustering of monomeric GTPases of the Ras superfamily». *Mol Cell Proteomics*, vol. 4, no 7, p. 936-944.

- Chan, Perry M., Louis Lim et Edward Manser. 2008. «PAK Is Regulated by PI3K, PIX, CDC42, and PP2C $\hat{\pm}$  and Mediates Focal Adhesion Turnover in the Hyperosmotic Stress-induced p38 Pathway». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no 36, p. 24949-24961.
- Chang, F., C. A. Lemmon, D. Park et L. H. Romer. 2007. «FAK potentiates Rac1 activation and localization to matrix adhesion sites: a role for betaPIX». *Mol Biol Cell*, vol. 18, no 1, p. 253-264.
- Chen, L. Y., C. S. Rex, M. S. Casale, C. M. Gall et G. Lynch. 2007. «Changes in synaptic morphology accompany actin signaling during LTP». *J Neurosci*, vol. 27, no 20, p. 5363-5372.
- Chen, W., S. Chen, S. F. Yap et L. Lim. 1996. «The *Caenorhabditis elegans* p21-activated kinase (CePAK) colocalizes with CeRac1 and CDC42Ce at hypodermal cell boundaries during embryo elongation». *J Biol Chem*, vol. 271, no 42, p. 26362-26368.
- Chen, X., et I. G. Macara. 2006. «Par-3 mediates the inhibition of LIM kinase 2 to regulate cofilin phosphorylation and tight junction assembly». *J Cell Biol*, vol. 172, no 5, p. 671-678.
- Chew, T. L., R. A. Masaracchia, Z. M. Goeckeler et R. B. Wysolmerski. 1998. «Phosphorylation of non-muscle myosin II regulatory light chain by p21-activated kinase (gamma-PAK)». *J Muscle Res Cell Motil*, vol. 19, no 8, p. 839-854.
- Chisholm, A. D., et J. Hardin. 2005. «Epidermal morphogenesis». *WormBook*, p. 1-22.
- Chklovskii, D. B. 2004. «Synaptic connectivity and neuronal morphology: two sides of the same coin». *Neuron*, vol. 43, no 5, p. 609-617.
- Chrivia, J. C., R. P. Kwok, N. Lamb, M. Hagiwara, M. R. Montminy et R. H. Goodman. 1993. «Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP». *Nature*, vol. 365, no 6449, p. 855-859.
- Colicelli, J. 2004. «Human RAS superfamily proteins and related GTPases». *Sci STKE*, vol. 2004, no 250, p. RE13.
- Cox, E. A., et J. Hardin. 2004. «Sticky worms: adhesion complexes in *C. elegans*». *J Cell Sci*, vol. 117, no Pt 10, p. 1885-1897..
- Cruz-Monserrate, Z., et K. L. O'Connor. 2008. «Integrin alpha 6 beta 4 promotes migration, invasion through Tiam1 upregulation, and subsequent Rac activation». *Neoplasia*, vol. 10, no 5, p. 408-417.



- D'Souza-Schorey, C., R. L. Boshans, M. McDonough, P. D. Stahl et L. Van Aelst. 1997. «A role for POR1, a Rac1-interacting protein, in ARF6-mediated cytoskeletal rearrangements». *EMBO J*, vol. 16, no 17, p. 5445-5454.
- Dal Santo, P., M. A. Logan, A. D. Chisholm et E. M. Jorgensen. 1999. «The inositol trisphosphate receptor regulates a 50-second behavioral rhythm in *C. elegans*». *Cell*, vol. 98, no 6, p. 757-767.
- Daniels, R. H., F. T. Zenke et G. M. Bokoch. 1999. «alphaPix stimulates p21-activated kinase activity through exchange factor-dependent and -independent mechanisms». *J Biol Chem*, vol. 274, no 10, p. 6047-6050.
- Denu, J. M., J. A. Stuckey, M. A. Saper et J. E. Dixon. 1996. «Form and function in protein dephosphorylation». *Cell*, vol. 87, no 3, p. 361-364.
- des Portes, V., N. Soufir, A. Carrie, P. Billuart, T. Bienvenu, M. C. Vinet, C. Beldjord, G. Ponsot, A. Kahn, J. Boue et J. Chelly. 1997. «Gene for nonspecific X-linked mental retardation (MRX 47) is located in Xq22.3-q24». *Am J Med Genet*, vol. 72, no 3, p. 324-328.
- Di Cesare, A., S. Paris, C. Albertinazzi, S. Dariozzi, J. Andersen, M. Mann, R. Longhi et I. de Curtis. 2000. «p95-APP1 links membrane transport to Rac-mediated reorganization of actin». *Nat Cell Biol*, vol. 2, no 8, p. 521-530.
- Diana, G., G. Valentini, S. Travaglione, L. Falzano, M. Pieri, C. Zona, S. Meschini, A. Fabbri et C. Fiorentini. 2007. «Enhancement of learning and memory after activation of cerebral Rho GTPases». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, no 2, p. 636-641.
- Dierssen, M., et G. J. Ramakers. 2006. «Dendritic pathology in mental retardation: from molecular genetics to neurobiology». *Genes Brain Behav*, vol. 5 Suppl 2, p. 48-60.
- Dillon, C., et Y. Goda. 2005. «The actin cytoskeleton: integrating form and function at the synapse». *Annu Rev Neurosci*, vol. 28, p. 25-55.
- Diogon, M., F. Wissler, S. Quintin, Y. Nagamatsu, S. Sookhareea, F. Landmann, H. Hutter, N. Vitale et M. Labouesse. 2007. «The RhoGAP RGA-2 and LET-502/ROCK achieve a balance of actomyosin-dependent forces in *C. elegans* epidermis to control morphogenesis». *Development*, vol. 134, no 13, p. 2469-2479.
- Dolphin, C. T., et I. A. Hope. 2006. «Caenorhabditis elegans reporter fusion genes generated by seamless modification of large genomic DNA clones». *Nucleic Acids Res*, vol. 34, no 9, p. e72.

- Donnelly, A. J., M. W. Partington, A. K. Ryan et J. C. Mulley. 1996. «Regional localisation of two non-specific X-linked mental retardation genes (MRX30 and MRX31)». *Am J Med Genet*, vol. 64, no 1, p. 113-120.
- Dow, L. E., J. S. Kauffman, J. Caddy, K. Zarbalis, A. S. Peterson, S. M. Jane, S. M. Russell et P. O. Humbert. 2007. «The tumour-suppressor Scribble dictates cell polarity during directed epithelial migration: regulation of Rho GTPase recruitment to the leading edge». *Oncogene*, vol. 26, no 16, p. 2272-2282.
- Eisenmann, D. M., J. N. Maloof, J. S. Simske, C. Kenyon et S. K. Kim. 1998. «The beta-catenin homolog BAR-1 and LET-60 Ras coordinately regulate the Hox gene *lin-39* during *Caenorhabditis elegans* vulval development». *Development*, vol. 125, no 18, p. 3667-3680.
- Endris, V., B. Wogatzky, U. Leimer, D. Bartsch, M. Zatyka, F. Latif, E. R. Maher, G. Tariverdian, S. Kirsch, D. Karch et G. A. Rappold. 2002. «The novel Rho-GTPase activating gene MEGAP/ srGAP3 has a putative role in severe mental retardation». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 99, no 18, p. 11754-11759.
- Engert, F., et T. Bonhoeffer. 1999. «Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity». *Nature*, vol. 399, no 6731, p. 66-70.
- Estrada, L., E. Caron et J. L. Gorski. 2001. «Fgd1, the Cdc42 guanine nucleotide exchange factor responsible for faciogenital dysplasia, is localized to the subcortical actin cytoskeleton and Golgi membrane». *Hum Mol Genet*, vol. 10, no 5, p. 485-495. En ligne.
- Faucherre, A., P. Desbois, V. Satre, J. Lunardi, O. Dorseuil et G. Gacon. 2003. «Lowe syndrome protein OCRL1 interacts with Rac GTPase in the trans-Golgi network». *Hum Mol Genet*, vol. 12, no 19, p. 2449-2456.
- Feng, Q., J. G. Albeck, R. A. Cerione et W. Yang. 2002. «Regulation of the Cool/Pix proteins: key binding partners of the Cdc42/Rac targets, the p21-activated kinases». *J Biol Chem*, vol. 277, no 7, p. 5644-5650.
- Feng, Q., D. Baird et R. A. Cerione. 2004. «Novel regulatory mechanisms for the Dbl family guanine nucleotide exchange factor Cool-2/ $\alpha$ -Pix». *EMBO J*, vol. 23, no 17, p. 3492-3504.
- Feng, Q., D. Baird, X. Peng, J. Wang, T. Ly, J. L. Guan et R. A. Cerione. 2006. «Cool-1 functions as an essential regulatory node for EGF receptor- and Src-mediated cell growth». *Nat Cell Biol*, vol. 8, no 9, p. 945-956.

- Filipenko, N. R., S. Attwell, C. Roskelley et S. Dedhar. 2005. «Integrin-linked kinase activity regulates Rac- and Cdc42-mediated actin cytoskeleton reorganization via alpha-PIX». *Oncogene*, vol. 24, no 38, p. 5837-5849.
- Frank, S. R., et S. H. Hansen. 2008. «The PIX-GIT complex: a G protein signaling cassette in control of cell shape». *Semin Cell Dev Biol*, vol. 19, no 3, p. 234-244.
- Gallo, G., et P. C. Letourneau. 1998. «Axon guidance: GTPases help axons reach their targets». *Curr Biol*, vol. 8, no 3, p. R80-82.
- Gally, C., F. Wissler, H. Zahreddine, S. Quintin, F. Landmann et M. Labouesse. 2009. «Myosin II regulation during *C. elegans* embryonic elongation: LET-502/ROCK, MRCK-1 and PAK-1, three kinases with different roles». *Development*, vol. 136, no 18, p. 3109-3119.
- Gavina, M., L. Za, R. Molteni, R. Pardi et I. Curtis. «The GIT-PIX complexes regulate the chemotactic response of rat basophilic leukaemia cells». *Biol Cell*, vol. 102, no 4, p. 231-244.
- Geiger, B., D. Salomon, M. Takeichi et R. O. Hynes. 1992. «A chimeric N-cadherin/beta 1-integrin receptor which localizes to both cell-cell and cell-matrix adhesions». *J Cell Sci*, vol. 103 ( Pt 4), p. 943-951.
- Genda, T., M. Sakamoto, T. Ichida, H. Asakura et S. Hirohashi. 2000. «Loss of cell-cell contact is induced by integrin-mediated cell-substratum adhesion in highly-motile and highly-metastatic hepatocellular carcinoma cells». *Lab Invest*, vol. 80, no 3, p. 387-394.
- Gleason, J. E., H. C. Korswagen et D. M. Eisenmann. 2002. «Activation of Wnt signaling bypasses the requirement for RTK/Ras signaling during *C. elegans* vulval induction». *Genes Dev*, vol. 16, no 10, p. 1281-1290.
- Goehler, H., M. Lalowski, U. Stelzl, S. Waelter, M. Stroedicke, U. Worm, A. Droege, K. S. Lindenberg, M. Knoblich, C. Haenig, M. Herbst, J. Suopanki, E. Scherzinger, C. Abraham, B. Bauer, R. Hasenbank, A. Fritzsche, A. H. Ludewig, K. Bussow, S. H. Coleman, C. A. Gutekunst, B. G. Landwehrmeyer, H. Lehrach et E. E. Wanker. 2004. «A protein interaction network links GIT1, an enhancer of huntingtin aggregation, to Huntington's disease». *Mol Cell*, vol. 15, no 6, p. 853-865.
- Goetzl, Edward J., et Songzhu An. 1998. «Diversity of cellular receptors and functions for the lysophospholipid growth factors lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate». *FASEB J.*, vol. 12, no 15, p. 1589-1598.

- Goldberg, J. 1998. «Structural basis for activation of ARF GTPase: mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching». *Cell*, vol. 95, no 2, p. 237-248.
- Govek, E. E., S. E. Newey, C. J. Akerman, J. R. Cross, L. Van der Veken et L. Van Aelst. 2004. «The X-linked mental retardation protein oligophrenin-1 is required for dendritic spine morphogenesis». *Nat Neurosci*, vol. 7, no 4, p. 364-372.
- Govek, E. E., S. E. Newey et L. Van Aelst. 2005. «The role of the Rho GTPases in neuronal development». *Genes Dev*, vol. 19, no 1, p. 1-49.
- Gray, J. M., J. J. Hill et C. I. Bargmann. 2005. «A circuit for navigation in *Caenorhabditis elegans*». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 102, no 9, p. 3184-3191.
- Guidi, S., P. Bonasoni, C. Ceccarelli, D. Santini, F. Gualtieri, E. Ciani et R. Bartesaghi. 2008. «Neurogenesis impairment and increased cell death reduce total neuron number in the hippocampal region of fetuses with Down syndrome». *Brain Pathol*, vol. 18, no 2, p. 180-197.
- Gumbiner, B. M. 1996. «Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis». *Cell*, vol. 84, no 3, p. 345-357.
- Gupta, A., B. S. Lee, M. A. Khadeer, Z. Tang, M. Chellaiah, Y. Abu-Amer, J. Goldknopf et K. A. Hruska. 2003. «Leupaxin is a critical adaptor protein in the adhesion zone of the osteoclast». *J Bone Miner Res*, vol. 18, no 4, p. 669-685.
- Gutmann, D. H., D. L. Wood et F. S. Collins. 1991. «Identification of the neurofibromatosis type 1 gene product». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 88, no 21, p. 9658-9662. En ligne.
- Haendeler, J., G. Yin, Y. Hojo, Y. Saito, M. Melaragno, C. Yan, V. K. Sharma, M. Heller, R. Aebersold et B. C. Berk. 2003. «GIT1 mediates Src-dependent activation of phospholipase Cgamma by angiotensin II and epidermal growth factor». *J Biol Chem*, vol. 278, no 50, p. 49936-49944.
- Hall, A. 1998. «Rho GTPases and the actin cytoskeleton». *Science*, vol. 279, no 5350, p. 509-514.
- Harel, S., et S. Jenna. 2010. «Soigner le retard mental: à la recherche d'équilibre». *Médecines Sciences*, vol. in Press.
- Harel, S., A.W. Lee et S. Jenna (2009). git-1, pix-1 and pak-1 control embryo elongation through induction of myosin light chain phosphorylation in *Caenorhabditis elegans*. International Worm Meeting . WBPaper00033547. The 17th international C.elegans Meeting. Los Angeles

- Hayashi, M. L., B. S. Rao, J. S. Seo, H. S. Choi, B. M. Dolan, S. Y. Choi, S. Chattarji et S. Tonegawa. 2007. «Inhibition of p21-activated kinase rescues symptoms of fragile X syndrome in mice». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, no 27, p. 11489-11494..
- Herzberg, Christina, Lope Andrés Flórez Weidinger, Bastian Dörrbecker, Sebastian Hübner, Jörg Stülke et Fabian M. Commichau. 2007. «SPINE: A method for the rapid detection and analysis of protein-protein interactions *in vivo*». *PROTEOMICS*, vol. 7, no 22, p. 4032-4035.
- Hills, T., P. J. Brockie et A. V. Maricq. 2004. «Dopamine and glutamate control area-restricted search behavior in *Caenorhabditis elegans*». *J Neurosci*, vol. 24, no 5, p. 1217-1225.
- Hresko, M. C., B. D. Williams et R. H. Waterston. 1994. «Assembly of body wall muscle and muscle cell attachment structures in *Caenorhabditis elegans*». *J Cell Biol*, vol. 124, no 4, p. 491-506.
- Hubbard, E. J., et D. Greenstein. 2000. «The *Caenorhabditis elegans* gonad: a test tube for cell and developmental biology». *Dev Dyn*, vol. 218, no 1, p. 2-22.
- Huber, K. M., S. M. Gallagher, S. T. Warren et M. F. Bear. 2002. «Altered synaptic plasticity in a mouse model of fragile X mental retardation». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 99, no 11, p. 7746-7750.
- Iino, Y., et M. Yamamoto. 1998. «Expression pattern of the *C. elegans* P21-activated protein kinase, CePAK». *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 245, no 1, p. 177-184.
- Imamura, H., K. Takaishi, K. Nakano, A. Kodama, H. Oishi, H. Shiozaki, M. Monden, T. Sasaki et Y. Takai. 1998. «Rho and Rab small G proteins coordinately reorganize stress fibers and focal adhesions in MDCK cells». *Mol Biol Cell*, vol. 9, no 9, p. 2561-2575. E
- Ishihara, H., B. L. Martin, D. L. Brautigan, H. Karaki, H. Ozaki, Y. Kato, N. Fusetani, S. Watabe, K. Hashimoto, D. Uemura et al. 1989. «Calyculin A and okadaic acid: inhibitors of protein phosphatase activity». *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 159, no 3, p. 871-877.
- Ivanov, D., M. Philippova, V. Tkachuk, P. Erne et T. Resink. 2004. «Cell adhesion molecule T-cadherin regulates vascular cell adhesion, phenotype and motility». *Exp Cell Res*, vol. 293, no 2, p. 207-218.
- Jaffer, Z. M., et J. Chernoff. 2002. «p21-activated kinases: three more join the Pak». *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 34, no 7, p. 713-717.

- Jantsch-Plunger, V., P. Gonczy, A. Romano, H. Schnabel, D. Hamill, R. Schnabel, A. A. Hyman et M. Glotzer. 2000. «CYK-4: A Rho family gtpase activating protein (GAP) required for central spindle formation and cytokinesis». *J Cell Biol*, vol. 149, no 7, p. 1391-1404.
- Janz, J. M., T. P. Sakmar et K. C. Min. 2007. «A novel interaction between atrophin-interacting protein 4 and beta-p21-activated kinase-interactive exchange factor is mediated by an SH3 domain». *J Biol Chem*, vol. 282, no 39, p. 28893-28903.
- Jee, C., J. Lee, J. I. Lee, W. H. Lee, B. J. Park, J. R. Yu, E. Park, E. Kim et J. Ahnn. 2004. «SHN-1, a Shank homologue in *C. elegans*, affects defecation rhythm via the inositol-1,4,5-trisphosphate receptor». *FEBS Lett*, vol. 561, no 1-3, p. 29-36.
- Jenna, S., M. E. Caruso, A. Emadali, D. T. Nguyen, M. Dominguez, S. Li, R. Roy, J. Reboul, M. Vidal, G. N. Tzimas, R. Bosse et E. Chevet. 2005. «Regulation of membrane trafficking by a novel Cdc42-related protein in *Caenorhabditis elegans* epithelial cells». *Mol Biol Cell*, vol. 16, no 4, p. 1629-1639.
- Jones, N. P., et M. Katan. 2007. «Role of phospholipase Cgamma1 in cell spreading requires association with a beta-Pix/GIT1-containing complex, leading to activation of Cdc42 and Rac1». *Mol Cell Biol*, vol. 27, no 16, p. 5790-5805.
- Jozic, D., N. Cardenes, Y. L. Deribe, G. Moncalian, D. Hoeller, Y. Groemping, I. Dikic, K. Rittinger et J. Bravo. 2005. «Cbl promotes clustering of endocytic adaptor proteins». *Nat Struct Mol Biol*, vol. 12, no 11, p. 972-979.
- Juo, P., et J. M. Kaplan. 2004. «The anaphase-promoting complex regulates the abundance of GLR-1 glutamate receptors in the ventral nerve cord of *C. elegans*». *Curr Biol*, vol. 14, no 22, p. 2057-2062.
- Kaletta, Titus, et Michael O. Hengartner. 2006. «Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism». *Nat Rev Drug Discov*, vol. 5, no 5, p. 387-399.
- Kaufmann, W. E., et H. W. Moser. 2000. «Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation». *Cereb Cortex*, vol. 10, no 10, p. 981-991.
- Kim, S., J. Ko, H. Shin, J. R. Lee, C. Lim, J. H. Han, W. D. Altmann, C. C. Garner, E. D. Gundelfinger, R. T. Premont, B. K. Kaang et E. Kim. 2003. «The GIT family of proteins forms multimers and associates with the presynaptic cytomatrix protein Piccolo». *J Biol Chem*, vol. 278, no 8, p. 6291-6300.
- Kimura, Kazushi, Masaaki Ito, Mutsuki Amano, Kazuyasu Chihara, Yuko Fukata, Masato Nakafuku, Bunpei Yamamori, Jianhua Feng, Takeshi Nakano, Katsuya Okawa, Akihiro

- Iwamatsu et Kozo Kaibuchi. 1996. «Regulation of Myosin Phosphatase by Rho and Rho-Associated Kinase (Rho-Kinase)». *Science*, vol. 273, no 5272, p. 245-248.
- Ko, J., S. Kim, J. G. Valtschanoff, H. Shin, J. R. Lee, M. Sheng, R. T. Premont, R. J. Weinberg et E. Kim. 2003. «Interaction between liprin-alpha and GIT1 is required for AMPA receptor targeting». *J Neurosci*, vol. 23, no 5, p. 1667-1677.
- Kovacs, M., J. Toth, C. Hetenyi, A. Malnasi-Csizmadia et J. R. Sellers. 2004. «Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II». *J Biol Chem*, vol. 279, no 34, p. 35557-35563.
- Kreis, P., et J. V. Barnier. 2009. «PAK signalling in neuronal physiology». *Cell Signal*, vol. 21, no 3, p. 384-393.
- Krucker, T., G. R. Siggins et S. Halpain. 2000. «Dynamic actin filaments are required for stable long-term potentiation (LTP) in area CA1 of the hippocampus». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 97, no 12, p. 6856-6861.
- Kutsche, K., et A. Gal. 2001. «The mouse Arhgef6 gene: cDNA sequence, expression analysis, and chromosome assignment». *Cytogenet Cell Genet*, vol. 95, no 3-4, p. 196-201..
- Kutsche, K., H. Yntema, A. Brandt, I. Jantke, H. G. Nothwang, U. Orth, M. G. Boavida, D. David, J. Chelly, J. P. Fryns, C. Moraine, H. H. Ropers, B. C. Hamel, H. van Bokhoven et A. Gal. 2000. «Mutations in ARHGEF6, encoding a guanine nucleotide exchange factor for Rho GTPases, in patients with X-linked mental retardation». *Nat Genet*, vol. 26, no 2, p. 247-250.
- Kwan, C. S., R. P. Vazquez-Manrique, S. Ly, K. Goyal et H. A. Baylis. 2008. «TRPM channels are required for rhythmicity in the ultradian defecation rhythm of *C. elegans*». *BMC Physiol*, vol. 8, p. 11.
- Labouesse, M. 2006. «Epithelial junctions and attachments». *WormBook*, p. 1-21..
- Laggerbauer, B., D. Ostareck, E. M. Keidel, A. Ostareck-Lederer et U. Fischer. 2001. «Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation». *Hum Mol Genet*, vol. 10, no 4, p. 329-338.
- Lahuna, O., M. Quellari, C. Achard, S. Nola, G. Meduri, C. Navarro, N. Vitale, J. P. Borg et M. Misrahi. 2005. «Thyrotropin receptor trafficking relies on the hScrib-betaPIX-GIT1-ARF6 pathway». *EMBO J*, vol. 24, no 7, p. 1364-1374.
- Lau, C. G., et R. S. Zukin. 2007. «NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders». *Nat Rev Neurosci*, vol. 8, no 6, p. 413-426..



- Lauffenburger, D. A., et A. F. Horwitz. 1996. «Cell migration: a physically integrated molecular process». *Cell*, vol. 84, no 3, p. 359-369.
- Lee, E. C., D. Yu, J. Martinez de Velasco, L. Tessarollo, D. A. Swing, D. L. Court, N. A. Jenkins et N. G. Copeland. 2001. «A highly efficient Escherichia coli-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA». *Genomics*, vol. 73, no 1, p. 56-65.
- Lee, R. Y., L. Lobel, M. Hengartner, H. R. Horvitz et L. Avery. 1997. «Mutations in the  $\alpha 1$  subunit of an L-type voltage-activated  $\text{Ca}^{2+}$  channel cause myotonia in *Caenorhabditis elegans*». *EMBO J*, vol. 16, no 20, p. 6066-6076.
- Lee, T., C. Winter, S. S. Marticke, A. Lee et L. Luo. 2000. «Essential roles of *Drosophila* RhoA in the regulation of neuroblast proliferation and dendritic but not axonal morphogenesis». *Neuron*, vol. 25, no 2, p. 307-316.
- Lee, Y-W.A., R. Perreault, S. Harel, E. Boulier, M. Suderman, M. Hallett et S. Jenna. 2010. «Searching for signaling balance through the identification of genetic interactors of the Rab Guanine-nucleotide dissociation inhibitor *gdi-1*». *PLOs One*, vol. In press.
- Legouis, R., A. Gansmuller, S. Sookhareea, J. M. Boshier, D. L. Baillie et M. Labouesse. 2000. «LET-413 is a basolateral protein required for the assembly of adherens junctions in *Caenorhabditis elegans*». *Nat Cell Biol*, vol. 2, no 7, p. 415-422.
- Levitan, D., et I. Greenwald. 1995. «Facilitation of lin-12-mediated signalling by sel-12, a *Caenorhabditis elegans* S182 Alzheimer's disease gene». *Nature*, vol. 377, no 6547, p. 351-354.
- Li, Z., Y. Wang, J. Song, H. Kataoka, S. Yoshii, C. Gao, J. Zhou, S. Ota, M. Tanaka et H. Sugimura. 2002. «Genomic structure of the human beta-PIX gene and its alteration in gastric cancer». *Cancer Lett*, vol. 177, no 2, p. 203-208.
- Liu, X. F., H. Ishida, R. Raziuddin et T. Miki. 2004. «Nucleotide exchange factor ECT2 interacts with the polarity protein complex Par6/Par3/protein kinase  $\zeta$  (PKC $\zeta$ ) and regulates PKC $\zeta$  activity». *Mol Cell Biol*, vol. 24, no 15, p. 6665-6675.
- Loo, T. H., Y. W. Ng, L. Lim et E. Manser. 2004. «GIT1 activates p21-activated kinase through a mechanism independent of p
- Lucanic, M., et H. J. Cheng. 2008. «A RAC/CDC-42-independent GIT/PIX/PAK signaling pathway mediates cell migration in *C. elegans*». *PLoS Genet*, vol. 4, no 11, p. e1000269.

- Lucanic, M., M. Kiley, N. Ashcroft, N. L'Etoile et H. J. Cheng. 2006. «The *Caenorhabditis elegans* P21-activated kinases are differentially required for UNC-6/netrin-mediated commissural motor axon guidance». *Development*, vol. 133, no 22, p. 4549-4559.
- Lundquist, E. A. 2006. «Small GTPases». *WormBook*, p. 1-18.
- Lynch, M. A. 2004. «Long-term potentiation and memory». *Physiol Rev*, vol. 84, no 1, p. 87-136.
- Mahoney, T. R., S. Luo, E. K. Round, M. Brauner, A. Gottschalk, J. H. Thomas et M. L. Nonet. 2008. «Intestinal signaling to GABAergic neurons regulates a rhythmic behavior in *Caenorhabditis elegans*». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 105, no 42, p. 16350-16355.
- Malenka, R. C., et M. F. Bear. 2004. «LTP and LTD: an embarrassment of riches». *Neuron*, vol. 44, no 1, p. 5-21.
- Malinow, R., et R. C. Malenka. 2002. «AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity». *Annu Rev Neurosci*, vol. 25, p. 103-126.
- Manabe, R., M. Kovalenko, D. J. Webb et A. R. Horwitz. 2002. «GIT1 functions in a motile, multi-molecular signaling complex that regulates protrusive activity and cell migration». *J Cell Sci*, vol. 115, no Pt 7, p. 1497-1510.
- Maricq, A. V., E. Peckol, M. Driscoll et C. I. Bargmann. 1995. «Mechanosensory signalling in *C. elegans* mediated by the GLR-1 glutamate receptor». *Nature*, vol. 378, no 6552, p. 78-81.
- McCarter, J., B. Bartlett, T. Dang et T. Schedl. 1997. «Soma-germ cell interactions in *Caenorhabditis elegans*: multiple events of hermaphrodite germline development require the somatic sheath and spermathecal lineages». *Dev Biol*, vol. 181, no 2, p. 121-143.
- Mello, C., et A. Fire. 1995. «DNA transformation». *Methods Cell Biol*, vol. 48, p. 451-482..
- Meng, J., Y. Meng, A. Hanna, C. Janus et Z. Jia. 2005. «Abnormal long-lasting synaptic plasticity and cognition in mice lacking the mental retardation gene *Pak3*». *J Neurosci*, vol. 25, no 28, p. 6641-6650.
- Moghal, N., et P. W. Sternberg. 2003. «The epidermal growth factor system in *Caenorhabditis elegans*». *Exp Cell Res*, vol. 284, no 1, p. 150-159.
- Morice, Elise, Jean-Marie Billard, Cecile Denis, Flavie Mathieu, Catalina Betancur, Jacques Epelbaum, Bruno Giros et Marika Nosten-Bertrand. 2007. «Parallel Loss of

- Hippocampal LTD and Cognitive Flexibility in a Genetic Model of Hyperdopaminergia». *Neuropsychopharmacology*, vol. 32, no 10, p. 2108-2116.
- Morris, R. G., F. Schenk, F. Tweedie et L. E. Jarrard. 1990. «Ibotenate Lesions of Hippocampus and/or Subiculum: Dissociating Components of Allocentric Spatial Learning». *Eur J Neurosci*, vol. 2, no 12, p. 1016-1028.
- Mukoyama, Y., A. Utani, S. Matsui, S. Zhou, Y. Miyachi et N. Matsuyoshi. 2007. «T-cadherin enhances cell-matrix adhesiveness by regulating beta1 integrin trafficking in cutaneous squamous carcinoma cells». *Genes Cells*, vol. 12, no 6, p. 787-796.
- Muller, H. A., et O. Bossinger. 2003. «Molecular networks controlling epithelial cell polarity in development». *Mech Dev*, vol. 120, no 11, p. 1231-1256.
- Murai, K. K., L. N. Nguyen, F. Irie, Y. Yamaguchi et E. B. Pasquale. 2003. «Control of hippocampal dendritic spine morphology through ephrin-A3/EphA4 signaling». *Nat Neurosci*, vol. 6, no 2, p. 153-160.
- Muranyi, A., R. Zhang, F. Liu, K. Hirano, M. Ito, H. F. Epstein et D. J. Hartshorne. 2001. «Myotonic dystrophy protein kinase phosphorylates the myosin phosphatase targeting subunit and inhibits myosin phosphatase activity». *FEBS Lett*, vol. 493, no 2-3, p. 80-84.
- Nakae, J., W. H. Biggs, 3rd, T. Kitamura, W. K. Cavenee, C. V. Wright, K. C. Arden et D. Accili. 2002. «Regulation of insulin action and pancreatic beta-cell function by mutated alleles of the gene encoding forkhead transcription factor Foxo1». *Nat Genet*, vol. 32, no 2, p. 245-253.
- Nakayama, A. Y., M. B. Harms et L. Luo. 2000. «Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons». *J Neurosci*, vol. 20, no 14, p. 5329-5338.
- Nayal, A., D. J. Webb, C. M. Brown, E. M. Schaefer, M. Vicente-Manzanares et A. R. Horwitz. 2006. «Paxillin phosphorylation at Ser273 localizes a GIT1-PIX-PAK complex and regulates adhesion and protrusion dynamics». *J Cell Biol*, vol. 173, no 4, p. 587-589.
- Nielsen, E., A. Y. Cheung et T. Ueda. 2008. «The regulatory RAB and ARF GTPases for vesicular trafficking». *Plant Physiol*, vol. 147, no 4, p. 1516-1526.
- Nikolopoulos, S. N., et C. E. Turner. 2000. «Actopaxin, a new focal adhesion protein that binds paxillin LD motifs and actin and regulates cell adhesion». *J Cell Biol*, vol. 151, no 7, p. 1435-1448.

- Nishiya, N., T. Shirai, W. Suzuki et K. Nose. 2002. «Hic-5 interacts with GIT1 with a different binding mode from paxillin». *J Biochem*, vol. 132, no 2, p. 279-289.
- Nobes, C. D., et A. Hall. 1995. «Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia». *Cell*, vol. 81, no 1, p. 53-62.
- Norman, J. C., D. Jones, S. T. Barry, M. R. Holt, S. Cockcroft et D. R. Critchley. 1998. «ARF1 mediates paxillin recruitment to focal adhesions and potentiates Rho-stimulated stress fiber formation in intact and permeabilized Swiss 3T3 fibroblasts». *J Cell Biol*, vol. 143, no 7, p. 1981-1995.
- Norman, K. R., R. T. Fazio, J. E. Mellem, M. V. Espelt, K. Strange, M. C. Beckerle et A. V. Maricq. 2005. «The Rho/Rac-family guanine nucleotide exchange factor VAV-1 regulates rhythmic behaviors in *C. elegans*». *Cell*, vol. 123, no 1, p. 119-132.
- Nusser, Z., R. Lujan, G. Laube, J. D. Roberts, E. Molnar et P. Somogyi. 1998. «Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus». *Neuron*, vol. 21, no 3, p. 545-559.
- Ogg, S., S. Paradis, S. Gottlieb, G. I. Patterson, L. Lee, H. A. Tissenbaum et G. Ruvkun. 1997. «The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*». *Nature*, vol. 389, no 6654, p. 994-999.
- Oh, W.-C., M. Dwivedi, J. Ahnn et B. J. Park (2006). Characterization of in vivo function of Shank using deletion mutants in *Caenorhabditis elegans*. Meeting abstract . WBPaper00031708
- Olofsson, B. 1999. «Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling». *Cell Signal*, vol. 11, no 8, p. 545-554.
- Palacios, F., L. Price, J. Schweitzer, J. G. Collard et C. D'Souza-Schorey. 2001. «An essential role for ARF6-regulated membrane traffic in adherens junction turnover and epithelial cell migration». *EMBO J*, vol. 20, no 17, p. 4973-4986.
- Park, E., M. Na, J. Choi, S. Kim, J. R. Lee, J. Yoon, D. Park, M. Sheng et E. Kim. 2003. «The Shank family of postsynaptic density proteins interacts with and promotes synaptic accumulation of the beta PIX guanine nucleotide exchange factor for Rac1 and Cdc42». *J Biol Chem*, vol. 278, no 21, p. 19220-19229.
- Parnas, D., A. P. Haghighi, R. D. Fetter, S. W. Kim et C. S. Goodman. 2001. «Regulation of postsynaptic structure and protein localization by the Rho-type guanine nucleotide exchange factor dPix». *Neuron*, vol. 32, no 3, p. 415-424.

- Pascalis, O., et J. Bachevalier. 1999. «Neonatal aspiration lesions of the hippocampal formation impair visual recognition memory when assessed by paired-comparison task but not by delayed nonmatching-to-sample task». *Hippocampus*, vol. 9, no 6, p. 609-616.
- Patel, M. R., E. K. Lehrman, V. Y. Poon, J. G. Crump, M. Zhen, C. I. Bargmann et K. Shen. 2006. «Hierarchical assembly of presynaptic components in defined *C. elegans* synapses». *Nat Neurosci*, vol. 9, no 12, p. 1488-1498.
- Peck, J., G. th Douglas, C. H. Wu et P. D. Burbelo. 2002. «Human RhoGAP domain-containing proteins: structure, function and evolutionary relationships». *FEBS Lett*, vol. 528, no 1-3, p. 27-34.
- Pedone, K., E. Peters, C. Der et D. Reiner. 2008. «Dissecting whole-tissue CED-10/Rac function in morphogenesis». *Development & evolution Meeting*, vol. WBPaper00034902.
- Petrij, F., R. H. Giles, H. G. Dauwerse, J. J. Saris, R. C. Hennekam, M. Masuno, N. Tommerup, G. J. van Ommen, R. H. Goodman, D. J. Peters et et al. 1995. «Rubinstein-Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co-activator CBP». *Nature*, vol. 376, no 6538, p. 348-351.
- Pfeiffer, Brad E., et Kimberly M. Huber. 2007. «Fragile X Mental Retardation Protein Induces Synapse Loss through Acute Postsynaptic Translational Regulation». *J. Neurosci.*, vol. 27, no 12, p. 3120-3130.
- Piekny, A. J., J. L. Johnson, G. D. Cham et P. E. Mains. 2003. «The *Caenorhabditis elegans* nonmuscle myosin genes *nmy-1* and *nmy-2* function as redundant components of the *let-502*/Rho-binding kinase and *mel-11*/myosin phosphatase pathway during embryonic morphogenesis». *Development*, vol. 130, no 23, p. 5695-5704..
- Piekny, A. J., et P. E. Mains. 2002. «Rho-binding kinase (*LET-502*) and myosin phosphatase (*MEL-11*) regulate cytokinesis in the early *Caenorhabditis elegans* embryo». *J Cell Sci*, vol. 115, no Pt 11, p. 2271-2282.
- , 2003. «Squeezing an egg into a worm: *C. elegans* embryonic morphogenesis». *ScientificWorldJournal*, vol. 3, p. 1370-1381.
- Piekny, A. J., A. Wissmann et P. E. Mains. 2000. «Embryonic morphogenesis in *Caenorhabditis elegans* integrates the activity of *LET-502* Rho-binding kinase, *MEL-11* myosin phosphatase, *DAF-2* insulin receptor and *FEM-2* PP2c phosphatase». *Genetics*, vol. 156, no 4, p. 1671-1689.

- Pilpel, Y., et M. Segal. 2004. «Activation of PKC induces rapid morphological plasticity in dendrites of hippocampal neurons via Rac and Rho-dependent mechanisms». *Eur J Neurosci*, vol. 19, no 12, p. 3151-3164.
- Pogacar, S., N. F. Nora et T. L. Kemper. 1973. «Neuropathological findings in the rubinstein-taybi syndrome». *R I Med J*, vol. 56, no 3, p. 114-121.
- Premont, R. T., A. Claing, N. Vitale, J. L. Freeman, J. A. Pitcher, W. A. Patton, J. Moss, M. Vaughan et R. J. Lefkowitz. 1998. «beta2-Adrenergic receptor regulation by GIT1, a G protein-coupled receptor kinase-associated ADP ribosylation factor GTPase-activating protein». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 95, no 24, p. 14082-14087.
- Premont, R. T., A. Claing, N. Vitale, S. J. Perry et R. J. Lefkowitz. 2000. «The GIT family of ADP-ribosylation factor GTPase-activating proteins. Functional diversity of GIT2 through alternative splicing». *J Biol Chem*, vol. 275, no 29, p. 22373-22380.
- Premont, R. T., S. J. Perry, R. Schmalzigaug, J. T. Roseman, Y. Xing et A. Claing. 2004. «The GIT/PIX complex: an oligomeric assembly of GIT family ARF GTPase-activating proteins and PIX family Rac1/Cdc42 guanine nucleotide exchange factors». *Cell Signal*, vol. 16, no 9, p. 1001-1011.
- Priess, J. R., et D. I. Hirsh. 1986. «Caenorhabditis elegans morphogenesis: the role of the cytoskeleton in elongation of the embryo». *Dev Biol*, vol. 117, no 1, p. 156-173.
- Purpura, D. P. 1974. «Dendritic spine "dysgenesis" and mental retardation». *Science*, vol. 186, no 4169, p. 1126-1128.
- Qin, J., et A. R. Wheeler. 2007. «Maze exploration and learning in C. elegans». *Lab Chip*, vol. 7, no 2, p. 186-192.
- Qin, Y., C. Capaldo, B. M. Gumbiner et I. G. Macara. 2005. «The mammalian Scribble polarity protein regulates epithelial cell adhesion and migration through E-cadherin». *J Cell Biol*, vol. 171, no 6, p. 1061-1071.
- Quinn, C. C., D. S. Pfeil et W. G. Wadsworth. 2008. «CED-10/Rac1 mediates axon guidance by regulating the asymmetric distribution of MIG-10/lamellipodin». *Curr Biol*, vol. 18, no 11, p. 808-813.
- Radhakrishna, H., O. Al-Awar, Z. Khachikian et J. G. Donaldson. 1999. «ARF6 requirement for Rac ruffling suggests a role for membrane trafficking in cortical actin rearrangements». *J Cell Sci*, vol. 112 ( Pt 6), p. 855-866.

- Radhakrishna, H., R. D. Klausner et J. G. Donaldson. 1996. «Aluminum fluoride stimulates surface protrusions in cells overexpressing the ARF6 GTPase». *J Cell Biol*, vol. 134, no 4, p. 935-947.
- Ramakers, G. J. 2002. «Rho proteins, mental retardation and the cellular basis of cognition». *Trends Neurosci*, vol. 25, no 4, p. 191-199.
- Rameh, L. E., A. Arvidsson, K. L. Carraway, 3rd, A. D. Couvillon, G. Rathbun, A. Crompton, B. VanRenterghem, M. P. Czech, K. S. Ravichandran, S. J. Burakoff, D. S. Wang, C. S. Chen et L. C. Cantley. 1997. «A comparative analysis of the phosphoinositide binding specificity of pleckstrin homology domains». *J Biol Chem*, vol. 272, no 35, p. 22059-22066.
- Ran, I., I. Laplante, C. Bourgeois, J. Pepin, P. Lacaille, M. Costa-Mattioli, J. Pelletier, N. Sonenberg et J. C. Lacaille. 2009. «Persistent transcription- and translation-dependent long-term potentiation induced by mGluR1 in hippocampal interneurons». *J Neurosci*, vol. 29, no 17, p. 5605-5615.
- Randazzo, P. A., H. Inoue et S. Bharti. 2007. «Arf GAPs as regulators of the actin cytoskeleton». *Biol Cell*, vol. 99, no 10, p. 583-600.
- Resjo, S., A. Oknianska, S. Zolnierowicz, V. Manganiello et E. Degerman. 1999. «Phosphorylation and activation of phosphodiesterase type 3B (PDE3B) in adipocytes in response to serine/threonine phosphatase inhibitors: deactivation of PDE3B in vitro by protein phosphatase type 2A». *Biochem J*, vol. 341 ( Pt 3), p. 839-845.
- Rex, C. S., L. Y. Chen, A. Sharma, J. Liu, A. H. Babayan, C. M. Gall et G. Lynch. 2009. «Different Rho GTPase-dependent signaling pathways initiate sequential steps in the consolidation of long-term potentiation». *J Cell Biol*, vol. 186, no 1, p. 85-97.
- Richter, J. D., et E. Klann. 2009. «Making synaptic plasticity and memory last: mechanisms of translational regulation». *Genes Dev*, vol. 23, no 1, p. 1-11.
- Ridley, A. J. 2006. «Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking». *Trends Cell Biol*, vol. 16, no 10, p. 522-529.
- Riento, K., et A. J. Ridley. 2003. «Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour». *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 4, no 6, p. 446-456.
- Rohrschneider, M. R., et J. Nance. 2009. «Polarity and cell fate specification in the control of *Caenorhabditis elegans* gastrulation». *Dev Dyn*, vol. 238, no 4, p. 789-796.
- Rongo, C., et J. M. Kaplan. 1999. «CaMKII regulates the density of central glutamatergic synapses in vivo». *Nature*, vol. 402, no 6758, p. 195-199.



- Rongo, C., C. W. Whitfield, A. Rodal, S. K. Kim et J. M. Kaplan. 1998. «LIN-10 is a shared component of the polarized protein localization pathways in neurons and epithelia». *Cell*, vol. 94, no 6, p. 751-759.
- Rosenberger, G., A. Gal et K. Kutsche. 2005. «AlphaPIX associates with calpain 4, the small subunit of calpain, and has a dual role in integrin-mediated cell spreading». *J Biol Chem*, vol. 280, no 8, p. 6879-6889.
- Rosenberger, G., I. Jantke, A. Gal et K. Kutsche. 2003. «Interaction of alphaPIX (ARHGEF6) with beta-parvin (PARVB) suggests an involvement of alphaPIX in integrin-mediated signaling». *Hum Mol Genet*, vol. 12, no 2, p. 155-167.
- Roth, M. G. 1999. «Snapshots of ARF1: implications for mechanisms of activation and inactivation». *Cell*, vol. 97, no 2, p. 149-152.
- Roussignol, Gautier, Fabrice Ango, Stefano Romorini, Jian Cheng Tu, Carlo Sala, Paul F. Worley, Joel Bockaert et Laurent Fagni. 2005. «Shank Expression Is Sufficient to Induce Functional Dendritic Spine Synapses in Aspinous Neurons». *J. Neurosci.*, vol. 25, no 14, p. 3560-3570.
- Ruchhoeft, M. L., S. Ohnuma, L. McNeill, C. E. Holt et W. A. Harris. 1999. «The neuronal architecture of Xenopus retinal ganglion cells is sculpted by rho-family GTPases in vivo». *J Neurosci*, vol. 19, no 19, p. 8454-8463.
- Rushforth, A. M., C. C. White et P. Anderson. 1998. «Functions of the Caenorhabditis elegans regulatory myosin light chain genes *mlc-1* and *mlc-2*». *Genetics*, vol. 150, no 3, p. 1067-1077.
- Sahai, E., M. F. Olson et C. J. Marshall. 2001. «Cross-talk between Ras and Rho signalling pathways in transformation favours proliferation and increased motility». *EMBO J*, vol. 20, no 4, p. 755-766.
- Salminen, A., T. Suuronen et K. Kaarniranta. 2008. «ROCK, PAK, and Toll of synapses in Alzheimer's disease». *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 371, no 4, p. 587-590.
- Saneyoshi, T., G. Wayman, D. Fortin, M. Davare, N. Hoshi, N. Nozaki, T. Natsume et T. R. Soderling. 2008. «Activity-dependent synaptogenesis: regulation by a CaM-kinase kinase/CaM-kinase I/betaPIX signaling complex». *Neuron*, vol. 57, no 1, p. 94-107.
- Santy, L. C., et J. E. Casanova. 2002. «GTPase signaling: bridging the GAP between ARF and Rho». *Curr Biol*, vol. 12, no 10, p. R360-362.

- Sassone-Corsi, P., C. A. Mizzen, P. Cheung, C. Crosio, L. Monaco, S. Jacquot, A. Hanauer et C. D. Allis. 1999. «Requirement of Rsk-2 for epidermal growth factor-activated phosphorylation of histone H3». *Science*, vol. 285, no 5429, p. 886-891.
- Schenck, A., B. Bardoni, C. Langmann, N. Harden, J. L. Mandel et A. Giangrande. 2003. «CYFIP/Sra-1 controls neuronal connectivity in *Drosophila* and links the Rac1 GTPase pathway to the fragile X protein». *Neuron*, vol. 38, no 6, p. 887-898.
- Schikorski, T., et C. F. Stevens. 1997. «Quantitative ultrastructural analysis of hippocampal excitatory synapses». *J Neurosci*, vol. 17, no 15, p. 5858-5867.
- Schiller, Martin R., Kausik Chakrabarti, Glenn F. King, Noraisha I. Schiller, Betty A. Eipper et Mark W. Maciejewski. 2006. «Regulation of RhoGEF Activity by Intramolecular and Intermolecular SH3 Domain Interactions». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no 27, p. 18774-18786.
- Schlaitz, A. L., M. Srayko, A. Dammermann, S. Quintin, N. Wielsch, I. MacLeod, Q. de Robillard, A. Zinke, J. R. Yates, 3rd, T. Muller-Reichert, A. Shevchenko, K. Oegema et A. A. Hyman. 2007. «The *C. elegans* RSA complex localizes protein phosphatase 2A to centrosomes and regulates mitotic spindle assembly». *Cell*, vol. 128, no 1, p. 115-127.
- Schlenker, O., et K. Rittinger. 2009. «Structures of dimeric GIT1 and trimeric beta-PIX and implications for GIT-PIX complex assembly». *J Mol Biol*, vol. 386, no 2, p. 280-289.
- Severson, A. F., D. L. Baillie et B. Bowerman. 2002. «A Formin Homology protein and a profilin are required for cytokinesis and Arp2/3-independent assembly of cortical microfilaments in *C. elegans*». *Curr Biol*, vol. 12, no 24, p. 2066-2075.
- Shenolikar, S. 1994. «Protein serine/threonine phosphatases--new avenues for cell regulation». *Annu Rev Cell Biol*, vol. 10, p. 55-86.
- Simske, J. S., et S. K. Kim. 1995. «Sequential signalling during *Caenorhabditis elegans* vulval induction». *Nature*, vol. 375, no 6527, p. 142-146.
- Sonnichsen, B., L. B. Koski, A. Walsh, P. Marschall, B. Neumann, M. Brehm, A. M. Alleaume, J. Artelt, P. Bettencourt, E. Cassin, M. Hewitson, C. Holz, M. Khan, S. Lazik, C. Martin, B. Nitzsche, M. Ruer, J. Stamford, M. Winzi, R. Heinkel, M. Roder, J. Finell, H. Hantsch, S. J. Jones, M. Jones, F. Piano, K. C. Gunsalus, K. Oegema, P. Gonczy, A. Coulson, A. A. Hyman et C. J. Echeverri. 2005. «Full-genome RNAi profiling of early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*». *Nature*, vol. 434, no 7032, p. 462-469.

- Squire, L. R., D. G. Amaral et G. A. Press. 1990. «Magnetic resonance imaging of the hippocampal formation and mammillary nuclei distinguish medial temporal lobe and diencephalic amnesia». *J Neurosci*, vol. 10, no 9, p. 3106-3117.
- States, D. J., G. S. Omenn, T. W. Blackwell, D. Fermin, J. Eng, D. W. Speicher et S. M. Hanash. 2006. «Challenges in deriving high-confidence protein identifications from data gathered by a HUPO plasma proteome collaborative study». *Nat Biotechnol*, vol. 24, no 3, p. 333-338.
- Stavropoulos, T. A., et C. A. Strathdee. 2001. «Synergy between tetA and rpsL provides high-stringency positive and negative selection in bacterial artificial chromosome vectors». *Genomics*, vol. 72, no 1, p. 99-104.
- Steven, R., L. Zhang, J. Culotti et T. Pawson. 2005. «The UNC-73/Trio RhoGEF-2 domain is required in separate isoforms for the regulation of pharynx pumping and normal neurotransmission in *C. elegans*». *Genes Dev*, vol. 19, no 17, p. 2016-2029.
- Stirling, L., M. R. Williams et A. D. Morielli. 2009. «Dual roles for RHOA/RHO-kinase in the regulated trafficking of a voltage-sensitive potassium channel». *Mol Biol Cell*, vol. 20, no 12, p. 2991-3002.
- Stockton, R., J. Reutershan, D. Scott, J. Sanders, K. Ley et M. A. Schwartz. 2007. «Induction of vascular permeability: beta PIX and GIT1 scaffold the activation of extracellular signal-regulated kinase by PAK». *Mol Biol Cell*, vol. 18, no 6, p. 2346-2355.
- Sundaram, M., et I. Greenwald. 1993. «Suppressors of a lin-12 hypomorph define genes that interact with both lin-12 and glp-1 in *Caenorhabditis elegans*». *Genetics*, vol. 135, no 3, p. 765-783.
- Sutton, M. A., et E. M. Schuman. 2006. «Dendritic protein synthesis, synaptic plasticity, and memory». *Cell*, vol. 127, no 1, p. 49-58.
- Symons, M., et N. Rusk. 2003. «Control of vesicular trafficking by rho GTPases». *Curr Biol*, vol. 13, no 19, p. 1747.
- Takai, Y., T. Sasaki et T. Matozaki. 2001. «Small GTP-binding proteins». *Physiol Rev*, vol. 81, no 1, p. 153-208.
- Takeichi, M., K. Hatta, A. Nose, A. Nagafuchi et M. Matsunaga. 1989. «Cadherin-mediated specific cell adhesion and animal morphogenesis». *Ciba Found Symp*, vol. 144, p. 243-249; discussion 250-244, 290-245. En ligne. <

- Takizawa, N., Y. Koga et M. Ikebe. 2002. «Phosphorylation of CPI17 and myosin binding subunit of type 1 protein phosphatase by p21-activated kinase». *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 297, no 4, p. 773-778..
- Thomas, J. H. 1990. «Genetic analysis of defecation in *Caenorhabditis elegans*». *Genetics*, vol. 124, no 4, p. 855-872.
- Timmons, L., D. L. Court et A. Fire. 2001. «Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*». *Gene*, vol. 263, no 1-2, p. 103-112.
- Tolias, K. F., J. B. Bikoff, A. Burette, S. Paradis, D. Harrar, S. Tavazoie, R. J. Weinberg et M. E. Greenberg. 2005. «The Rac1-GEF Tiam1 couples the NMDA receptor to the activity-dependent development of dendritic arbors and spines». *Neuron*, vol. 45, no 4, p. 525-538.
- Totaro, A., S. Paris, C. Asperti et I. de Curtis. 2007. «Identification of an intramolecular interaction important for the regulation of GIT1 functions». *Mol Biol Cell*, vol. 18, no 12, p. 5124-5138.
- Trivier, E., D. De Cesare, S. Jacquot, S. Pannetier, E. Zackai, I. Young, J. L. Mandel, P. Sassone-Corsi et A. Hanauer. 1996. «Mutations in the kinase Rsk-2 associated with Coffin-Lowry syndrome». *Nature*, vol. 384, no 6609, p. 567-570.
- Trovo-Marqui, A. B., et E. H. Tajara. 2006. «Neurofibromin: a general outlook». *Clin Genet*, vol. 70, no 1, p. 1-13.
- Trzebiatowska, A., U. Topf, U. Sauder, K. Drabikowski et R. Chiquet-Ehrismann. 2008. «*Caenorhabditis elegans* teneurin, ten-1, is required for gonadal and pharyngeal basement membrane integrity and acts redundantly with integrin *ina-1* and dystroglycan *dgn-1*». *Mol Biol Cell*, vol. 19, no 9, p. 3898-3908.
- Turner, C. E. 2000. «Paxillin interactions». *J Cell Sci*, vol. 113 Pt 23, p. 4139-4140.
- Turner, C. E., M. C. Brown, J. A. Perrotta, M. C. Riedy, S. N. Nikolopoulos, A. R. McDonald, S. Bagrodia, S. Thomas et P. S. Leventhal. 1999. «Paxillin LD4 motif binds PAK and PIX through a novel 95-kD ankyrin repeat, ARF-GAP protein: A role in cytoskeletal remodeling». *J Cell Biol*, vol. 145, no 4, p. 851-863.
- Van Aelst, L., et C. D'Souza-Schorey. 1997. «Rho GTPases and signaling networks». *Genes Dev*, vol. 11, no 18, p. 2295-2322.

- Vitale, N., W. A. Patton, J. Moss, M. Vaughan, R. J. Lefkowitz et R. T. Premont. 2000. «GIT proteins, A novel family of phosphatidylinositol 3,4, 5-trisphosphate-stimulated GTPase-activating proteins for ARF6». *J Biol Chem*, vol. 275, no 18, p. 13901-13906.
- Walczak-Sztulpa, J., M. Wisniewska, A. Latos-Bielenska, M. Linne, C. Kelbova, B. Belitz, L. Pfeiffer, V. Kalscheuer, F. Erdogan, A. W. Kuss, H. H. Ropers, R. Ullmann et A. Tzschach. 2008. «Chromosome deletions in 13q33-34: report of four patients and review of the literature». *Am J Med Genet A*, vol. 146, no 3, p. 337-342.
- Walker, D. S., N. J. Gower, S. Ly, G. L. Bradley et H. A. Baylis. 2002. «Regulated disruption of inositol 1,4,5-trisphosphate signaling in *Caenorhabditis elegans* reveals new functions in feeding and embryogenesis». *Mol Biol Cell*, vol. 13, no 4, p. 1329-1337.
- Walsh, Amy B., et Dafna Bar-Sagi. 2001. «Differential Activation of the Rac Pathway by Ha-Ras and K-Ras». *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no 19, p. 15609-15615.
- Waterhouse, A. M., J. B. Procter, D. M. Martin, M. Clamp et G. J. Barton. 2009. «Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench». *Bioinformatics*, vol. 25, no 9, p. 1189-1191.
- Welzl, H., D'Adamo, P., Wolfer, DP., Lipp, HP. (2006). Mouse models of hereditary mental retardation. . In: Transgenic and knockout models of neuropsychiatric disorders. Flint J. Pages Fisch GS. Totowa, New Jersey USA, Humana Press
- Wheeler, M., et H. Mellor. 2002. «The Rho GTPase family: a Racs to Wrchs story». *J Cell Sci*, vol. 115, no Pt 2, p. 239-240.
- Wienecke, R., A. Konig et J. E. DeClue. 1995. «Identification of tuberin, the tuberous sclerosis-2 product. Tuberin possesses specific Rap1GAP activity». *J Biol Chem*, vol. 270, no 27, p. 16409-16414.
- Wiens, K. M., H. Lin et D. Liao. 2005. «Rac1 induces the clustering of AMPA receptors during spinogenesis». *J Neurosci*, vol. 25, no 46, p. 10627-10636.
- Wilk-Blaszczak, M. A., W. D. Singer, T. Quill, B. Miller, J. A. Frost, P. C. Sternweis et F. Belardetti. 1997. «The monomeric G-proteins Rac1 and/or Cdc42 are required for the inhibition of voltage-dependent calcium current by bradykinin». *J Neurosci*, vol. 17, no 11, p. 4094-4100.
- Wilkinson, S., H. F. Paterson et C. J. Marshall. 2005. «Cdc42-MRCK and Rho-ROCK signalling cooperate in myosin phosphorylation and cell invasion». *Nat Cell Biol*, vol. 7, no 3, p. 255-261.

- Williams, B. D., et R. H. Waterston. 1994. «Genes critical for muscle development and function in *Caenorhabditis elegans* identified through lethal mutations». *J Cell Biol*, vol. 124, no 4, p. 475-490.
- Wissmann, A., J. Ingles et P. E. Mains. 1999. «The *Caenorhabditis elegans* mel-11 myosin phosphatase regulatory subunit affects tissue contraction in the somatic gonad and the embryonic epidermis and genetically interacts with the Rac signaling pathway». *Dev Biol*, vol. 209, no 1, p. 111-127.
- Xiao, G. H., F. Shoarinejad, F. Jin, E. A. Golemis et R. S. Yeung. 1997. «The tuberous sclerosis 2 gene product, tuberlin, functions as a Rab5 GTPase activating protein (GAP) in modulating endocytosis». *J Biol Chem*, vol. 272, no 10, p. 6097-6100.
- Yatani, A., K. Irie, T. Otani, M. Abdellatif et L. Wei. 2005. «RhoA GTPase regulates L-type  $\text{Ca}^{2+}$  currents in cardiac myocytes». *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 288, no 2, p. H650-659.
- Yokota, T., J. Kouno, K. Adachi, H. Takahashi, A. Teramoto, K. Matsumoto, Y. Sugisaki, M. Onda et T. Tsunoda. 2006. «Identification of histological markers for malignant glioma by genome-wide expression analysis: dynein, alpha-PIX and sorcin». *Acta Neuropathol*, vol. 111, no 1, p. 29-38.
- Yu, D., H. M. Ellis, E. C. Lee, N. A. Jenkins, N. G. Copeland et D. L. Court. 2000. «An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 97, no 11, p. 5978-5983.
- Yuce, O., A. Piekny et M. Glotzer. 2005. «An ECT2-centralspindlin complex regulates the localization and function of RhoA». *J Cell Biol*, vol. 170, no 4, p. 571-582.
- Zhang, H., D. J. Webb, H. Asmussen et A. F. Horwitz. 2003. «Synapse formation is regulated by the signaling adaptor GIT1». *J Cell Biol*, vol. 161, no 1, p. 131-142.
- Zhang, H., D. J. Webb, H. Asmussen, S. Niu et A. F. Horwitz. 2005. «A GIT1/PIX/Rac/PAK signaling module regulates spine morphogenesis and synapse formation through MLC». *J Neurosci*, vol. 25, no 13, p. 3379-3388.
- Zhang, Z. M., J. A. Simmerman, C. D. Guibao et J. J. Zheng. 2008. «GIT1 paxillin-binding domain is a four-helix bundle, and it binds to both paxillin LD2 and LD4 motifs». *J Biol Chem*, vol. 283, no 27, p. 18685-18693.
- Zhao, Z. S., E. Manser, T. H. Loo et L. Lim. 2000. «Coupling of PAK-interacting exchange factor PIX to GIT1 promotes focal complex disassembly». *Mol Cell Biol*, vol. 20, no 17, p. 6354-6363.

- Zheng, Y., P. J. Brockie, J. E. Mellem, D. M. Madsen et A. V. Maricq. 1999. «Neuronal control of locomotion in *C. elegans* is modified by a dominant mutation in the GLR-1 ionotropic glutamate receptor». *Neuron*, vol. 24, no 2, p. 347-361.
- Zheng, Y., D. J. Fischer, M. F. Santos, G. Tigyi, N. G. Pasteris, J. L. Gorski et Y. Xu. 1996. «The faciogenital dysplasia gene product FGD1 functions as a Cdc42Hs-specific guanine-nucleotide exchange factor». *J Biol Chem*, vol. 271, no 52, p. 33169-33172.
- Zhong, J., T. Zhang et L. M. Bloch. 2006. «Dendritic mRNAs encode diversified functionalities in hippocampal pyramidal neurons». *BMC Neurosci*, vol. 7, p. 17.
- Zhou, K., Y. Wang, J. L. Gorski, N. Nomura, J. Collard et G. M. Bokoch. 1998. «Guanine nucleotide exchange factors regulate specificity of downstream signaling from Rac and Cdc42». *J Biol Chem*, vol. 273, no 27, p. 16782-16786.
- Zhu, Y., M. T. Drake et S. Kornfeld. 1999. «ADP-ribosylation factor 1 dependent clathrin-coat assembly on synthetic liposomes». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 96, no 9, p. 5013-5018.
- Ziel, J. W., D. Q. Matus et D. R. Sherwood. 2009. «An expression screen for RhoGEF genes involved in *C. elegans* gonadogenesis». *Gene Expr Patterns*, vol. 9, no 6, p. 397-403..